

ノックアウトマウスを用いたDEAD-box RNA helicase D1Pas1の雄性生殖細胞における機能に関 する研究

著者	井上 弘貴
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17606号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00120795

ノックアウトマウスを用いた DEAD-box RNA helicase

D1Pas1 の雄性生殖細胞における機能に関する研究

井 上 弘 貴

博士論文

ノックアウトマウスを用いた DEAD-box RNA helicase D1Pas1 の
雄性生殖細胞における機能に関する研究

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

井 上 弘 貴

指導教員

種村 健太郎 教授

	目次	頁
第一章	緒論	4
第二章	<i>D1Pas1</i> KO マウスの作出と精巣機能解析	
第一節	緒言	10
第二節	材料および方法	11
第三節	結果	16
第四節	考察	17
第三章	<i>D1Pas1</i> KO 精母細胞における核局在タンパク質の局在解析 および <i>D1Pas1</i> KO 精巣におけるレトロトランスポゾンの発現解析	
第一節	緒言	21
第二節	材料および方法	23
第三節	結果	26
第四節	考察	30
第四章	<i>D1Pas1</i> KO マウス精巣の網羅的遺伝子発現解析	
第一節	緒言	33
第二節	材料および方法	34
第三節	結果	35
第四節	考察	36
第五章	総括	38

引用文献	45
謝辞	55
図表	57

第一章 緒論

精子発生とは、精祖細胞の自己複製・分化、相同染色体の対合・組み換えを含む減数分裂、精子細胞における核ヒストンのプロタミンへの置換および形態学的・細胞生化学的变化を経て、半数体である精子を作出する特殊な過程である。精子発生過程での遺伝子発現は、時期特異的かつ厳密に制御されており、この時期の遺伝子発現をかく乱することは、精子発生や精子の機能に影響を与えることが知られている (Matzuk, 2008; Miyata et al., 2016)。

遺伝子発現には DNA からのタンパク質をコードする mRNA の転写、mRNA からタンパク質への翻訳 (セントラルドグマ) と、非タンパク質コード RNA (non-coding RNA: ncRNA) の転写がある。セントラルドグマの中で RNA は遺伝情報を持つ DNA と実際に機能を持つ分子であるタンパク質をつなぐ中心的な役割を担っており、この RNA を制御することは遺伝子発現に大きな影響を及ぼすことが知られている (Sun et al., 2010; Sheng et al., 2006)。ncRNA にはタンパク質の翻訳に関与する tRNA や rRNA のほかに RNA のスプライシングに関与する small nuclear RNA (snRNA) や相補配列を持つ mRNA の発現を抑制する micro RNA (miRNA)、転写から翻訳まで広く関与する long non-coding RNA (lncRNA) などがあり、遺伝子発現に深く関与することが知られている。このことから RNA の制御は遺伝子の発現と密接に関与していることが考えられている。

RNA は RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein; RBP) とリボヌクレオ
プロテイン (ribonucleoprotein; RNP) と呼ばれる複合体を形成しており、RNA
の配列情報に加えて、プロセシングの状態や RBP の活性により合成から分解ま
での RNA 代謝が制御されている (Beckmenn et al., 2016)。RBP のファミリー
のひとつとして知られている DEAD box Family は 9 つの高度に保存されたド
メインを持つ RNA helicase であり、RNA に結合、ATP を消費し RNA の二次
構造を変化させる活性を持っている (Linder, 2006; Linder, 2011)。この活性に
より DEAD box RNA helicase は RNA の代謝すなわち転写、スプライシング、
RNA の輸送、翻訳、分解などに深く関与することが知られており、遺伝子発現
の制御に広く関与していると考えられる。マウス精巣においてもこの DEAD
box RNA helicase は発現しており、精巣特異的なものとしては Mouse vasa
homolog (Mvh / Ddx4) がよく知られている。MVH は精子発生過程において
MILI や miRNA と相互作用しレトロトランスポゾン mRNA の分解および転写
抑制機構に関与していることが近年明らかにされた (Kuramochi-Miyagawa et
al., 2010)。

Mvh と同様、生殖細胞特異的に発現する DEAD box RNA helicase として
D1Pas1 (DNA segment, Chr 1, Pasteur institute 1) がある。*D1Pas1* は *Pl10*
または *Ddx3l* と呼ばれ、もっとも古くから知られている DEAD-box RNA

helicase の一つである (Leroy et al., 1989)。 *D1Pas1* 遺伝子は第一染色体上に存在しており、ホモログとして X 染色体、Y 染色体にそれぞれ *Ddx3x* 遺伝子と *Dby* (*Ddx3y*) 遺伝子がある (Vong et al., 2006; Session et al., 2001; Dufan et al., 2001)。この二つのホモログは精巣だけでなく脳、心臓、肺などのほかの組織でも広範に発現がみられ (Vong et al., 2006)、最近、*Ddx3x* は胎盤形成や胚発生に重要な働きをしていることが組織特異的ノックアウト (conditional knockout: cKO) の解析により報告された (Chen et al., 2016)。ヒトにおいても *DDX3X* および *DBY* は精巣での発現がみられるが、マウス *D1Pas1* に相当する常染色体上のホモログ遺伝子は存在していない (Ditton et al., 2004; Kim et al., 2001)。ヒト *DBY* の欠損は生殖細胞が消失する Sertoli cell-only syndrome を引き起こすことから、*DBY* はヒトの精子発生に必須な因子として考えられている (Foresta et al., 2000)。一方で、マウスでは *Dby* 遺伝子が欠損していても精子細胞まで発生することが報告されていることから (Mazeyrat et al., 2001; Yamauchi et al., 2014)、少なくとも減数分裂の完了まで *Dby* は必須ではないと考えられている。そのためマウス精子発生においては *D1Pas1* もしくは *Ddx3x* が *Dby* の機能を補填している可能性が考えられる。すなわち、ヒト *DDX3X* / *DBY* の役割をマウスにおいては *Ddx3x* / *Dby* / *D1Pas1* のシステムが担っていることが示唆されている。

そこで、本研究第二章では D1Pas1 機能の重要性を調べることを目的とし、KO マウスを作出、表現型を解析した。D1Pas1 の発現時期および欠損による異常が起こる発生ステージについて形態学的に詳細に解析した。第三章ではパキテン期精母細胞での細胞死の原因を探るため、精母細胞核のタンパク質 (SYCP1、SYCP3、Mlh1、RNA pol II) の局在、およびレトロトランスポゾン発現を解析し、D1Pas1 欠損による異常がこれまでに報告されているパキテン期精母細胞での異常である相同染色体の対合、相同組み換え、性染色体の不活性化の異常やレトロトランスポゾンの脱抑制に起因するか否かを調べた。第三章では D1Pas1 欠損による遺伝子発現への影響を調べるため、マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、D1Pas1 を欠損した精巣の遺伝子発現状態が野生型と比較してどのように変動しているのか解析を行った。

第二章

D1Pas1 KO マウスの作出と精巣機能解析

第一節 緒言

D1Pas1 は精細胞特異的に発現する DEAD-box RNA helicase であり、精母細胞から伸長精子細胞の残余小体においてその mRNA の発現が報告されている (Leloy, 1988; Vong et al., 2006)。 *D1Pas1* の遺伝子はエクソンを一つしかもたない単一エクソンの遺伝子であることから、X 染色体上のホモログ、 *Ddx3x* から逆転写により転移したレトロジーンであると考えられている (Vong et al., 2006; Sedlacek et al., 1999)。マウス以外の種においても同様のレトロジーンは知られている (Kim et al., 2001; Liu et al., 2009; Chang and Liu, 2010)。例えば、ヒトにおいては第四染色体上に *DDX3X* 様の配列を持つことが知られている。しかしながらヒトにおいてはタンパク質コード領域の中に終止コドンを含むため機能的なタンパク質をコードしていない偽遺伝子であることが知られている (Kim et al., 2001)。そのためヒト精巣において DDX3 のホモログとしては *DDX3X* および *DBY* の二つの遺伝子が機能していると考えられる (Ditton et al., 2004; Foresta et al., 2000; Rauschendorf et al., 2014)。ヒトにおける *DBY* 遺伝子の欠損は sertoli-cell only syndrome を引き起こすことから、ヒト *DBY* は精子発生および精祖細胞の自己増殖に重要な役割を担っていることが考えられる (Foresta et al., 2000; Foresta et al., 2001)。その一方で、マウスでは *Dby*

を欠損したマウスにおいても精子細胞まで精子発生が進行することが知られているため、マウス *Dby* は少なくとも減数分裂の完了に必須ではないことが示唆されている (Mazeyrat et al., 2001; Yamauchi et al., 2014)。すなわち、*D1Pas1* が *Dby* の欠損を補填している可能性が考えられた。そこで、本章では *D1Pas1* の機能を調べるため、まず *D1Pas1* KO マウスを作出し、機能欠損による精巣機能への影響を解析した。

第二節 材料および方法

1) *D1Pas1* KO マウスの作出

D1Pas1 は一つのエクソンのみで構成されている単一エクソンの遺伝子であるため、エクソン 1 の開始コドンを含むタンパク質コード領域のほとんどを 1987 bp に亘って欠損させ、レポーターの *LacZ* 遺伝子 (β -Galactosidase をコード) および薬剤耐性遺伝子のネオマイシンを挿入した C57BL/6N 系統を遺伝的背景にもつ KO ES 細胞を米国 Knockout Mouse Project (KOMP) より導入し、ICR 系統の胚盤胞に顕微注入を行い、キメラマウスを作出した。導入した ES 細胞の詳細は米国 Knockout Mouse Project (KOMP) の website で閲覧可能である (<https://www.komp.org/geneinfo.php?Symbol=D1Pas1>)。作出したキメラマウスを野生型の C57BL/6N マウスと交配し、F1 のヘテロノックアウトマウス

ス (*D1Pas1*^{+/+}) を得た。得られた F1 マウス同士の交配により F2 としてホモノックアウトマウス (*D1Pas1*^{-/-}) を得た。得られたマウスは PCR により遺伝子型の確認を行った。Forward primer SU, 5'-ACT CAA CCG AGT GCT GTT CC-3'および reverse primer TUR, 5'-CGG TCA CTG AAG AAA CTG GAC TTG-3'により野生型のアリルを 598 bp のバンドとして検出し、forward primer SU および reverse primer LacZRev, 5'-GTC TGT CCT AGC TTC CTC ACT G-3' により *D1Pas1* 欠損アリルを 480 bp のバンドとして検出した。

本研究における全ての動物実験、組み換え実験について、理研つくば研究所の動物実験審査委員会 (IACUC of RIKEN Tsukuba Branch) の認可を受け、審査委員会の定める規程および遺伝子組み換え実験実施安全管理規程、筑波地区遺伝子組み換え実験実施安全管理規程細則を遵守した。

2) *D1Pas1* KO マウスの妊性試験

作出した *D1Pas1* KO マウスの妊性を調べるため交配実験を行った。妊性試験は生後 2 か月齢以降の性成熟の雄、雌のヘテロ、ホモの 4 通りの組み合わせに対して、2 か月間同じケージ内で同居させ、産仔が得られるか否かで妊性の有無を判定した。また、交配の有無についても膈栓の形成の有無を以って判定した。

3) D1Pas1 KO マウスの精巣・精巣上体の形態解析

性成熟後の雄ヘテロ、ホモ KO マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、精巣および精巣上体を摘出後、組織はブアン固定液 (SIGMA) を用いて室温で 24 時間固定した。固定した組織を 70 % エタノールに一晩×1 回、80 % エタノールに一晩×1 回、90 % エタノールに 1 時間×1 回、99.5 % エタノールに 1 時間×3 回浸漬し脱水し、透徹剤であるティッシュークリア (サクラファインテック) に 1 時間×3 回浸漬し透徹後、融解した融点 44 – 46 °C のパラフィンに 1 時間×1 回、パラフィンオーブン内で融解した融点 60 °C のパラフィンに 2 時間以上×3 回浸漬後、新しいパラフィンに組織を包埋した後に室温でパラフィンを固め (パラフィンプロック)、室温で保存した。作製したパラフィンプロックを、ミクロトーム (大和光機工業、RUB-21000) にて厚さ 4 μm で薄切し (パラフィン切片)、44 °C のウォーターバスで十分に伸展させたのち、MAS コート付きスライドガラス (松波硝子) に張り付け、透徹剤・脱パラフィン中間剤であるティッシュークリアに 5 分間×3 回浸漬し脱パラフィンした後、無水エタノールに 5 分間×3 回、90 % エタノールに 5 分間×1 回、80 % エタノールに 5 分間×1 回浸漬した後蒸留水に 3 分間×3 回浸漬し親水化した。同切片をマイヤー・ヘマトキシリン溶液 (武藤化学) で 1 分間染色後、流水に 10 分間曝して発色させた。発色後、蒸留水で 2 回洗浄し、エオシン溶液 (武藤化学) で 1 分間染色後、80 %

エタノールに 1 分間×1 回、90 % エタノールに 1 分間×1 回、99.5 % エタノールに 1 分間×3 回浸漬して脱水し、透徹剤・脱パラフィン中間剤であるティッシュークリアで脱アルコールした後、最後に封入剤のマルチマウント 480（松波硝子）を滴下した上からカバーガラスを被せ封入した。染色した標本は、明視野顕微鏡（Nikon, eclipse E800）で観察した。画像は DIGITALSIGHT DS-T（Nikon）を用いて取得した。精細管サイクルのステージ分類は Russell らの著書に従った（Russell et al., 1990）。

4) TUNEL 法

性成熟の雄ヘテロ、ホモ KO マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、精巣を摘出後、4 % パラホルムアルデヒド（PFA, SIGMA）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浸し、室温で 24 時間固定した後、前述と同様の方法でパラフィン包埋、薄切を行った。薄切した切片を上記の方法で脱パラフィンおよび親水化した後、97 °C の Histo VT One（nacalai tesque）中で 20 分間抗原賦活化をした後、流水で 20 分間洗浄し、内在性のペルオキシダーゼを不活性化するため 3 % 過酸化水素水で 20 分間室温処理した。さらに、2 % ウシ血清アルブミン（BSA）を含む PBS（2 % BSA – PBS）で室温 1 時間ブロッキングをした後、In Situ Cell Death Detection Kit, POD（Roche, cat # 11684817910）のプロトコールに

従って酵素処理、ペルオキシダーゼ反応を行った。すなわち酵素液 50 μ L と標識溶液 450 μ L を混ぜた溶液を切片にマウントし 37 °C、1 時間インキュベートし DNA 二重鎖断裂をフルオレセインで標識した。次に 50 μ L のコンバーターPOD（ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗フルオレセイン抗体 Fab フラグメント）をマウントし 37 °C、30 分間インキュベートした後、PBS で 3 回洗浄し、発色基質の 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) をマウントし適度に発色させ PBS で 2 回、蒸留水で 1 回洗浄した。洗浄後、ヘマトキシリン溶液に 30 秒浸漬し、流水に 10 分間曝し発色後上述の方法で脱水、脱アルコール、封入をした。明視野顕微鏡（Nikon, eclipse E800）で観察した。画像の取得は DIGITALSIGHT DS-T（Nikon）で行った。

5) 免疫蛍光染色

4) と同様の方法で精巣組織を固定、包埋し、薄切を行った。脱パラフィン、親水化の後 97 °C の Histo VT One 中で 20 分間抗原賦活化をした。流水で 20 分間洗浄した後、2 % BSA-PBS をマウントし 1 時間ブロッキングした後、ウサギ抗 β -Galactosidase 抗体（ROCKLAND, cat # 200-4136-0100）を 200 倍希釈した、抗体希釈液をマウントし 4 °C で一晩静置した。抗体反応後、PBS で 3 回洗浄し、Alexa555 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific, cat

A21430) を 2 % BSA – PBS で 500 倍希釈した抗体希釈液をマウントし 4 °C で 3 時間静置した。その後、PBS で 3 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, D-eclipse C1) にて観察、画像の取得を行った。

第三節 結果

KOMP より導入した ES 細胞から *D1Pas1* KO マウスを作出した (図 1)。
D1Pas1 は精巣特異的遺伝子であり、精巣での機能が示唆されているため (Vong et al., 2006)、作出した KO マウスはまず妊性試験に供した。2 か月間の妊性試験の結果、ヘテロ KO (*D1Pas1*^{+/−}) 雌雄およびホモ KO (*D1Pas1*^{−/−}) 雌マウスは正常な妊性を持つことが分かったが、*D1Pas1*^{−/−} 雄の個体はすべて (n = 6) 不妊となることがわかった (表 1)。次に、交配時の交尾の有無を、精液が膣で固まって形成される膣栓の有無で判定したところ *D1Pas1*^{−/−} 雄でも膣栓を形成する能力を持っている (n = 1) ことが分かった。次に不妊となる原因を調べるため、*D1Pas1*^{−/−} および *D1Pas1*^{+/−} 雄の精巣および精巣上体の形態を比較解析した。摘出した *D1Pas1*^{−/−} の精巣は野生型マウス精巣と比較して小さく、重量にして 3 分 1 以下 (29 ± 2 mg vs. 100 ± 3 mg; 平均値 ± 標準偏差) に減少していた (図 2)。HE 染色の結果から、*D1Pas1*^{+/−} 精巣および精巣上体では正常な精子細胞および精子が観察されるのに対し、*D1Pas1*^{−/−} 精巣では精子細胞が認めら

れず、精巣上体においても精子は存在せず、代わりにエオシン陽性の好酸性の死細胞が管腔内に観察された（図3）。Russell らの精細管のステージ分類法を基に精子発生を詳しく調べたところ、*D1Pas1*^{-/-} は Stage VIII – IX のパキテン期以降の精細胞が脱落していることが明らかになった（図4）。さらに TUNEL 法により細胞死を起こしている細胞を検出したところ、*D1Pas1*^{-/-} では stage VI のパキテン期以前の精細胞では細胞死は見られなかったが、stage VII – IX の間の精母細胞で細胞死を引き起こしていることを明らかにした（図5）。続いて *D1Pas1* の発現時期を調べるため *D1Pas1* KO アリルの *D1Pas1* 領域に挿入された *LacZ* より転写翻訳される β -Galactosidase (β -Gal) に対する免疫蛍光染色を、正常に精子発生を示す *D1Pas1*^{-/-} 精巣について行った。その結果、 β -Gal は stage I のパキテン期精母細胞までは検出されないが、stage V のパキテン期精母細胞から伸長精子細胞の残余小体まで検出された（図6）。

第四節 考察

D1Pas1 は DEAD-box family が定義された時から報告されていたタンパク質であるが、精巣特異的発現であるという以外の情報はほとんど明らかになっていなかった。DEAD-box RNA helicase は RNA の代謝に深く関与することが知られており（Linder 2006; Linder 2011）、*D1Pas1* も精巣において重要な役割

を担っていることが示唆されている (Vong et al 2006; Session et al., 2001)。

本章では *D1Pas1* の KO マウスを作出し、その表現型を解析した。まず、交配実験の結果から *D1Pas1*^{-/-} 雄マウスが不妊となることが明らかになった。また、交配時には膣栓が形成されたことから *D1Pas1*^{-/-} 雄マウスは交尾を行う能力を有しており、*D1Pas1*^{-/-} 雄マウスの不妊は、性成熟や性行動上の異常ではなく、射精された精液の異常による受精不全もしくは胚発生不全に起因することが示唆された。

次に、*D1Pas1*^{-/-} 精巣の形態解析により、精巣および精巣上体に精子細胞および精子が存在しないことから、不妊の原因が *D1Pas1*^{-/-} 精巣における精子発生に異常があり、精子を産生できないことであると明らかになった。また TUNEL 法と精細管ステージの詳細な解析により *D1Pas1* を欠損したマウスは stage VII – IX のパキテン期精母細胞において細胞死を引き起こし、それ以降の精細胞が脱落していることが明らかになった。このことから、*D1Pas1* は stage VII のパキテン期精母細胞以前で重要な機能を有していることが示唆された。

D1Pas1 がどの時期から機能しているのかを推測するため、*D1Pas1* KO アリルに挿入された *LacZ* から転写、翻訳される β -Gal に対する免疫蛍光染色により *D1Pas1* の mRNA の発現開始の時期を調べた。その結果 *D1Pas1* mRNA は stage I から V の間のパキテン期精母細胞から発現を開始することが示唆された。これ

は *D1Pas1* mRNA が精母細胞から伸長精子細胞の残余小体まで発現しているという知見と矛盾しない (Vong et al., 2006)。

以上の結果から、本章において *D1Pas1* は少なくとも stage V のパキテン期精母細胞から発現し、stage VII のパキテン期精母細胞に至るまでに重要な役割を担っていることが示唆された。また stage VII – IX の中期から後期のパキテン期精母細胞から急激に細胞死を起こしている精細胞が増えるため、stage VII 以前の発生段階で異常が起こっている可能性が考えられた。

第三章

D1Pas1 KO 精母細胞における核局在タンパク質の局在解析および

D1Pas1 KO 精巣におけるレトロトランスポゾンの発現解析

第一節 緒言

パキテン期精母細胞はマウスの精子発生過程のおよそ 4 分の 1 を占める非常に長い段階であり、この段階では減数分裂特有の現象、相同染色体の対合、相同染色体の組み換えや精母細胞特異的な構造である XY body の形成とそれに伴う性染色体の転写不活性化 (meiotic sex chromosome inactivation; MSCI) が起こることが知られている (Page et al., 2012)。まずパキテン期の初期で相同染色体の対合が完了し、続いて相同組み換えとその修復を行われ、パキテン期中期からは XY body の形成と MSCI が起こることが知られている。第二章の結果から、*D1Pas1*^{-/-} では stage VII の中期・後期パキテン期精母細胞で細胞死を引き起こすことが明らかとなった。そこで本章では *D1Pas1*^{-/-} 精母細胞においてこれらのパキテン期特異的な現象に異常がないか免疫蛍光染色によって解析した。XY bod と MSCI の大きさはごく微小であり、通常の免疫蛍光染色ではこれらの構造は観察できないため、chromosome spread と呼ばれる手法 (Peter et al., 1997; Barchi et al., 2009) を用いて細胞質を除去し核を広げた後、免疫蛍光染色を施し核内の微小構造について解析した。

次に、パキテン期でのレトロトランスポゾンの転写抑制機構について解析した。パキテン期では *D1Pas1* と同じ DEAD-box family の RNA helicase である

Mvh がレトロトランスポゾンの抑制に重要な役割を果たしている (Kuramochi-Miyagawa et al., 2010; Chuma and Nakano 2013)。MVH は MILI 等のタンパク質と複合体を形成し、piRNA と結合し ping-pong 経路によりレトロトランスポゾン RNA の分解に関与している。さらに MIWI2 がレトロトランスポゾン RNA の分解産物をリクルートしてレトロトランスポゾン領域の DNA メチル化を促し、レトロトランスポゾンの転写を抑制している。*Mvh* の欠損マウス精巣ではこの ping-pong 経路が働かないため、レトロトランスポゾン RNA および翻訳産物の発現上昇に加えレトロトランスポゾン領域の DNA 低メチル化が起こることが知られている。さらに *Mvh* 等と同様に piRNA を介した ping-pong 経路に関与する *Mili*, *Miwi*, および *Tdrd9* の欠損もまたレトロトランスポゾンの過剰発現を引き起こすことが報告されている (Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004; Shoji et al 2009)。*D1Pas1* についても同様の機能を持つ可能性があるため、*D1Pas1*^{-/-} 精巣においてもレトロトランスポゾンの過剰発現が起こっていないかレトロトランスポゾンの発現解析および DNA メチル化解析を行った。

第二節 材料および方法

1) Chromosome spread

採取した精巢からピンセットを用いて白膜を除去した後、滅菌した PBS 中で外科バサミにて細かく切り刻んだ。切り刻んだ精巢は、先を切った 1mL ピペットのチップでよくピペッティングした後、滅菌したナイロンメッシュにて濾過し、濾液を回収した。回収した濾液は洗浄のため 8 °C、800 g、5 分間遠心し、上清を除去し PBS を加え懸濁した。洗浄を 3 回行った後、pH を 8.0 に調整した 0.5 % NaCl を適量加え懸濁し、氷上で 20 分間静置した。静置した後、pH を 8.0 に調整した 2 % PFA (SDS を 0.03 % 含む) をマウントしたノンコーティングのスライドグラスに滴下し、4 °C で一晩固定、スライドグラス上に張り付けた。固定した細胞核を pH を 8.0 に調整した洗浄液 (Photoflo 200, Kodak を 250 倍希釈したもの) で 2 回洗浄後、室温で 10~20 分間乾燥させた。乾燥後、使用するまで - 80 °C で保存し、作製から 2 週間以内に使用した。作製したサンプルに 2 % BSA - PBS で希釈したウサギ抗 SYCP1 ポリクローナル抗体 (NOVUS Biologicals, cat # NB300-229)、抗 SYCP3 モノクローナル抗体 (abcam, cat # ab97672)、抗 Mlh1 モノクローナル抗体 (Gene Tex, cat # GTX14206)、抗 RNA polymerase II モノクローナル抗体 (abcam, cat # ab24758) をマウントし 4 °C 一晩静置した。PBS で 3 回洗浄した後、2 % BSA - PBS で希釈した DAPI、二

次抗体をマウントし 3 時間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、水銀ランプ付きの蛍光顕微鏡（Nikon, eclipse E800）で観察を行った。Mlh1 と SYCP1 の染色像のみ共焦点顕微鏡（Nikon, D-eclipse C1）と付属のソフトウェアにて観察・解析した。

2) 定量 RT – PCR

採取した精巣を直ちに液体窒素により急速凍結させた。凍結後使用まで -80°C で保存した。採取した精巣は Hatanaka らの方法に従って RNA 抽出、逆転写反応、Real time PCR に供した（Hatanaka et al., 2014）。凍結した精巣に TRIzol を加えホモジナイズし、室温で 15 分静置した。静置後クロロホルムを加え激しく攪拌し室温、3 分間静置した。12000 g、 4°C 、15 分間遠心を行い、その上層を回収した。回収した上層にイソプロピルアルコールを加え、室温で 10 分間静置した後 12000 g、 4°C 、10 分間遠心し total RNA を沈殿させた。沈殿させた RNA は洗浄のため 75 % エタノールを加え、ボルテックスにより攪拌し 7500 g、 4°C 、5 分間遠心した。上清を除去し RNA ペレットを室温で 10 分間乾燥した。乾燥後 RNase free の水に溶解させた。抽出した total RNA より SuperScript III、ランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。SYBR Green (Qiagen) をインターカレーターとして用い、

ABI7900 を使用してリアルタイム PCR を行った。解析は付属のソフトウェアを使用して行った。LINE-1 の検出は forward primer: 5'-AGT GCA GAG TTC TAT CAG ACC TTC-3' と reverse primer: 5'-AAC CTA CTT GGT CAG GAT GGA TG-3' を、SINE-B2 の検出は forward primer: 5'-GAG CAC CTG ACT GCT CTT CC-3' と reverse primer: 5'-ACA CAC CAG AAG AGG GCA TC-3' を、IAP の検出には forward primer: 5'-CTC CAT GTG CTC TGC CTT CC-3' と reverse primer: 5'-CCC CGT CCC TTT TTT AGG AGA-3' を用いた。3 回の独立した実験を行った。

3) バイサルファイトシーケンシング

摘出した精巢より EZ DNA Methylation-Direct kit (Zymo Research) を用いそのマニュアルに従ってゲノム DNA を抽出した。PCR 反応は TaKaRa EpiTaq HS (TaKaRa Bio) を用いた。LINE-1 のプライマーは forward primer: 5'-TAG GAA ATT AGTT TGA ATA GGT GAG AGG T-3' と reverse primer: 5'-TCA AAC ACT ATA TTA CTT TAA CAA TTC CCA-3' を用いた。IAP のプライマーは二つのペアを用いた。一つ目は forward primer: 5'-GGT GTT GAT AGT TGT GTT TTA aGT GGT AAA T-3' と reverse primer: 5'-ATT CTA ATC TAA AAT AAA AAA TCT TCC TTA-3' を、もう一つは forward primer: 5'-GAT AGT TGT

GTT TTA AGT GGT AAA TAA ATA-3'と reverse primer: 5'-ATT CTA ATT CTA AAA TAA AAA ATC TTC CTT A-3'を用いて行った。PCR 産物はプラスミドベクターpGEM-T Easy (Promega) へライゲーションしクローニングした後、シーケンシングを行った。3回の独立した実験を行った。

4) 免疫蛍光染色

摘出した精巣は2 % PFA-PBSにて固定後 OCT compound (SAKURA SEIKI Co., Ltd.)で包埋後 10 μ m で薄切した。薄切した切片はウサギ抗マウス L1-ORF1 抗体 (Dr. Sandra L. Martin より提供) とインキュベートした後、Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit IgG により標識した。核染色には 1 μ g/mL の Hoechst33258 (Sigma-Aldrich) を使用した。観察は BX61 microscope と DP70 CCD camera (Olympus) を用いて行った。

第三節 結果

生殖細胞で観察される相同染色体の対合はシナプトネマ複合体タンパク質 (synaptonemal complex protein; SYCP) の局在によって観察されることが知

られている (Roeder, 1997)。精母細胞の場合、レプトテン期より SYCP3 がそれぞれの染色体への局在を始め、サイゴテン期に入ると相同染色体の相同領域の SYCP3 を SYCP1 がつないでいく (対合) が始まり、パキテン期に入るとすべての相同染色体が対合を完了させる (Ishiguro et al 2014; Ishiguro et al., 2011; Fukuda et al., 2009)。 *D1Pas1*^{+/+} 精母細胞での相同染色体の対合が正常に起こっているか否かを明らかにするため、SYCP1 および 3 に対する免疫染色を Chromosome spread 法を用いた精母細胞に対して行った。その結果、 *D1Pas1*^{+/+} 精母細胞において、SYCP3 の局在が始まるレプトテン期、SYCP1 の局在に見られる対合が始まるサイゴテン期、すべての相同染色体が対合しているパキテン期の精母細胞がそれぞれ観察され、初期-中期パキテン期までは *D1Pas1*^{+/+} 精母細胞との違いは認められなかった (図 7)。また、SYCP1 の解離が始まる後期パキテン期の精母細胞は *D1Pas1*^{+/+} において観察されなかった。

次に対合の完了後に続いて起こる相同組み換えについて調べた。相同組み換えは相同染色体の対合とは独立して起こることが知られ (Lipkin et al., 2002)、相同染色体の対合した構造を安定化することで減数分裂の進行に必要であり、相同組み換えの不全が起こった場合、たとえ相同染色体の対合が完了していてもパキテン期精母細胞で発生を停止することが報告されている (Becherel et al 2013)。相同組み換えのマーカーとして相同組み換えによる二重鎖断裂の修復

する因子である *Mlh1* を用い、相同組み換えの異常がないかを免疫染色により調べた。その結果、*D1Pas1*^{-/-} 精母細胞においても野生型と同様に *Mlh1* のドット状の局在が観察された (図 8)。各細胞のドットの数 (foci) も計測した (図 8)。*D1Pas1*^{-/-} 精母細胞では野生型と比較して foci が少なく、student の t 検定により有意な差があったが異常として報告されている数 (0 ~ 10 foci) ではなかった (Dantzer et al., 2006)。次に、*D1Pas1*^{-/-} 精母細胞の核内における XY body 形成および同構造内での転写抑制の正常性を調べるため、DAPI 染色と SYCP1 および RNA polymerase II に対する免疫染色を実施した。その結果、*D1Pas1*^{-/-} 精母細胞においても野生型と同様、XY body の形成がみられ、RNA polymerase II の XY body への局在は見られなかった (図 9)。これらの結果から、*D1Pas1* KO においても相同染色体の対合、相同組み換え、XY body の形成と MSCI は正常であることが示唆された。

D1Pas1 と同じく DEAD-box family に属する *Mvh* は機能欠損により精母細胞でのレトロトランスポゾンの発現上昇を引き起こし、精子発生が停止することが近年報告された (Kuramochi-Miyagawa et al., 2010; Chuma and Nakano, 2013、図 10)。そのため *D1Pas1* の欠損においてもレトロトランスポゾンの発現上昇がみられるか否か解析した。発現解析は主要なレトロトランスポゾンの 3 つのサブクラス、すなわち配列の両端にプロモーター、エンハンサー、

Negative Regulatory Element (NRE) を含む LTR (long terminal repeat) 配列を持つ LTR 型の IAP (intracisternal A particle)、LTR 配列を持たない非 LTR 型の LINE-1 (long interspersed nuclear element) および SINE-B2 (short interspersed nuclear element) の mRNA に着目して行った。D1Pas1 の発現が始まる前の 8 日齢 (day 6)、D1Pas1 の発現が始まっている 16 日齢 (day 16) および *D1Pas1* 欠損による細胞死がすでに起こっている 26 日齢 (day 26) の *D1Pas1*^{-/-} 精巣と *D1Pas1*^{+/+} 精巣を用い、定量 RT-PCR により発現量を調べた。その結果、いずれの日齢においても *D1Pas1*^{-/-} 精巣 *D1Pas1*^{+/+} 精巣との間でレトロトランスポゾン mRNA の上昇の傾向は見られなかった (図 1 1)。次にレトロトランスポゾンの転写抑制が正常に起こっているかを明らかにするため、レトロトランスポゾン、LINE-1 および IAP 領域の DNA メチル化修飾状態を調べた。その結果、*D1Pas1*^{-/-} 精巣においても *D1Pas1*^{+/+} 精巣と同程度の DNA メチル化の蓄積がみられた (図 1 2)。最後に、タンパク質レベルでの発現がないか精巣凍結切片に対する免疫染色により調べた。その結果、*Mvh* KO と同様レトロトランスポゾンの過剰発現を引き起こす *Tdrd9* KO と比較して、*D1Pas1*^{-/-} 精巣においても LINE-1 タンパク質の過剰な発現していないことが示唆された (図 1 3)。

第四節 考察

D1Pas1^{-/-} では stage VII-IX ですべての後期パキテン期精母細胞が細胞死に至ることから、その直前に顕著な異常が起こっていると考えられた。これまでに相同染色体の対合や相同組み換え、XY body の形成、性染色体の転写不活性化 (MSCI) の異常が、パキテン期での精子発生停止の原因となることが報告されている (Fukuda et al., 2009; Akiyama et al., 2013; Shin et al., 2010; Yang et al., 2008)。そこで本章ではこれらの現象に着目し、解析を行った。しかしながら、相同染色体の対合、相同組み換え、XY body の形成、性染色体の不活性化 (MSCI) は *D1Pas1*^{-/-} 精母細胞においても正常に起こっていることから *D1Pas1* はこれらの現象には重要な役割を担っていないことが示唆された。また、*Mvh* 機能欠損に見られるレトロトランスポゾン (LINE-1、SINE-B2、IAP) の過剰発現は RNA レベルでもタンパク質レベルでも見られず、レトロトランスポゾン領域の DNA 低メチル化に見られる脱抑制も *D1Pas1* 欠損精巢においては見受けられなかった。このことから *D1Pas1* はレトロトランスポゾンの抑制制御に関して必須な因子ではないことが示された。RNA helicase として *Mvh* と類似した酵素活性を持つことが予想された *D1Pas1* だが、*Mvh* とは異なる役割を持っていることが考えられた。以上より本章では、パキテン期精母細胞における核タンパク質の局在と、同じファミリーのタンパク質である

Mvh との機能的類似性を解析したが、*D1Pas1*^{-/-} ではいずれも正常な表現型を示すことが分かった。すなわち、D1Pas1 はこれらの現象について重要な役割を持っていないことが示唆された。

第四章 *D1Pas1* KO マウス精巣の網羅的遺伝子発現解析

第一節 緒言

第三章の結果から D1Pas1 は相同染色体の対合、相同組み換え、XY body の形成、MSCI には必須でないことが示唆され、D1Pas1 の機能に関する情報は得られなかった。D1Pas1 が属する DEAD-box family は一番大きい RNA helicase のファミリーで RNA と結合し、その二本鎖の RNA をほどくことで RNA 活性を制御する機能を持ち、ほぼすべての RNA 代謝に関与していることが示唆されている (Linder and Jankowsky, 2011)。そのため D1Pas1 も RNA 代謝の制御を通じて遺伝子発現の制御に関与している可能性が考えられた。そこで本章では D1Pas1 欠損における遺伝子発現の異常を調べるために、マイクロアレイ法を用い *D1Pas1*^{-/-} マウスと野生型マウスの遺伝子発現を網羅的に比較、解析した。

D1Pas1^{-/-} 精巣では、野生型精巣とは異なり stage VII – IX のパキテン期精母細胞以降の精細胞が脱落していることから、性成熟した精巣を用いるとパキテン期以降の細胞での転写産物がすべて *D1Pas1*^{-/-} 精巣における異常として検出されてしまう。このことから、精巣のレプリングの時期を D1Pas1 の発現が開始する 12 日齢以降で、且つ *D1Pas1*^{-/-} 精巣には存在しない精子細胞が出現する 20 日齢以前である 18 日齢とし、同日齢の野生型マウス精巣および *D1Pas1*^{-/-} マウス精巣をマイクロアレイ解析に供した。

第二節 材料および方法

1) マイクロアレイ解析

アバチン麻酔下の 18 日齢の *D1Pas1*^{-/-} マウス (n = 4) および 18 日齢の野生型マウス (n = 4) から精巣を採取した。摘出した精巣は直ちに液体窒素中で急速凍結し、使用するまで -80 °C にて保存した。凍結した精巣に TRIzol を加え氷上でホモジナイズした。室温で 5 分間静置後、クロロホルムを加え 30 秒間激しく攪拌した。室温で 3 分間静置後、12000 g、4 °C、15 分間遠心した。上層を回収し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) のマニュアルに従って total RNA の抽出・精製した。total RNA は、抽出後、液体窒素により急速凍結し使用するまで -80 °C にて保存した。RNA は T7 プロモーターでラベル化し、T7 RNA polymerase により増幅および Cy-3 の取り込みを行った。Cy-3 で標識した RNA を精製したのちアレイスライド (SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60K) にアプライした。一晩ハイブリダイズさせた後、洗浄し Cy-3 の蛍光強度を検出した。検出後は解析ソフト Gene spring を用いて解析した。

2) 形態解析

マイクロアレイに供した野生型と *D1Pas1*^{-/-} マウスそれぞれ 1 個体からマイクロアレイに用いた精巣と反対側の精巣を採取し、4 % PFA-PBS で二晩固定し

た。固定後前述の方法でパラフィン包埋、薄切した後 HE 染色に供した。

第三節 結果

D1Pas1^{-/-} マウスでは精子細胞が存在しないため、野生型のマウス精巣において、精子細胞の出現前で、かつ *D1Pas1* の発現が認められる生後 18 日齢の精巣をマイクロアレイ解析に供した。18 日齢精巣について、まず HE 染色を行い野生型および *D1Pas1* KO 精巣に存在する細胞種を確認した (図 1 4)。マイクロアレイの主成分分析の結果、*D1Pas1*^{-/-} での遺伝子発現は component 1 により野生型の遺伝子発現と明確に分けることができた (図 1 5)。次に *D1Pas1*^{-/-} と野生型の精巣において遺伝子発現が二倍以上もしくは二分の一以下に有意に発現上昇もしくは低下している遺伝子を絞り込んだ (図 1 6)。*D1Pas1*^{-/-} において発現上昇しているものは 598 遺伝子 (プローブ数) あり、発現低下しているものは 2921 遺伝子あった。中でも顕著に発現上昇、低下を示す遺伝子のうち上位 20 遺伝子を表に示した (表 2, 3)。これらの遺伝子はどういうものが多いか、オンラインのバイオインフォマティクスリソースである DAVID 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) を使用し Gene Ontology (GO) 解析を行った。*D1Pas1*^{-/-} で 1/2 以下に発現低下している遺伝子で特に顕著に含まれていた GO は sexual reproduction, male gamete generation や

spermatogenesis などの生殖、精子発生関連の精巣特異的なものであった (図 17)。 *D1Pas1*^{-/-} で 2 倍以上に発現上昇している 598 遺伝子では defense response や transcription, gene expression, RNA metabolism の positive regulation に関する遺伝子が比較的多く含まれていた (図 18)。この中には未分化マーカーとして知られている Sox2、Myc 含まれていた。しかし、その p 値は有意ではあるものの (フィッシャーの正確確率検定)、発現低下遺伝子ほどには顕著ではなかった。また、*D1Pas1*^{-/-} で 2 倍以上に発現上昇している 598 遺伝子の約 16 % に当たる 96 遺伝子は X 染色体上の遺伝子であった (表 4, A – C)。

第四節 考察

DEAD-box family に属する RNA helicase は一般に RNA 代謝に関与することから、D1Pas1 も RNA 代謝に関与していると考えられる。そのため D1Pas1 を欠損すると遺伝子発現状態も変化する可能性が考えられた。予期した通り PCA 解析の結果より *D1Pas1*^{-/-} 精巣の遺伝子発現は野生型の遺伝子発現と大きく異なっていることが示唆された。*D1Pas1*^{-/-} 精巣では精子形成に関与する遺伝子が発現低下し、転写や遺伝子発現の正の制御に関与するいくつかの遺伝子が発現上昇する傾向があることが判明した。しかしながら、*D1Pas1*^{-/-} 精巣で発現低下した遺伝子は精子細胞で発現する遺伝子も多く含まれているため、D1Pas1 が欠

損したことによる直接の結果だけではなく *D1Pas1*^{-/-} マウス精巣において精子発生を停止したことによる構成する細胞比の違い、すなわち、*D1Pas1*^{-/-} マウス精巣には含まれない後期パキテン期およびディプロテン精母細胞特異的に発現する遺伝子も含まれていると考えられる。一方、発現上昇した遺伝子については、精子発生を停止により後期パキテン期、ディプロテン期精母細胞が欠損したことで相対的に 2 倍以上発現量に変動することは考えにくいため、これらの遺伝子は *D1Pas1* の欠損により発現が上昇した遺伝子であると考えられる。精子発生関連の遺伝子が発現低下したことによる補償作用として転写の正の制御因子の発現が上昇した可能性が考えられる。また X 染色体上の遺伝子が多く発現上昇したが、X 染色体上には精巣特異的遺伝子が多く存在していることが報告されており (Muller et al., 2008)、*D1Pas1*^{-/-} においても *Magea* family などの精巣特異的遺伝子の発現上昇したものがみられた。よって、正常精巣中で *D1Pas1* は、X 染色体上の精巣関連遺伝子を負に制御しているのかもしれない。

第五章 総括

本研究では、精巣における遺伝子発現制御機構の解明に貢献するため、RNA代謝に広く関与する因子である DEAD-box family の RNA helicase に着目し、中でもマウス精巣特異的に発現することが報告されている *D1Pas1* について焦点を合わせて解析を行った。

新たに作出した *D1Pas1* ノックアウトマウスの解析により、*D1Pas1*^{-/-} 雄マウスは完全に不妊となることが明らかになった。また、精巣の形態解析の結果、*D1Pas1*^{-/-} では stage VII のパキテン期精母細胞から細胞死が起こっていることが明らかになった。一方で *D1Pas1* mRNA の発現時期については *D1Pas1*^{-/-} マウス精巣における β -Gal の免疫染色により *D1Pas1* は stage V には転写されていることが明らかとなった。これは *D1Pas1*^{-/-} の表現型と矛盾しない結果となった。

マウスにおいて *D1Pas1* は性染色体上に2つのホモログ遺伝子 (X 染色体上の *Ddx3x* および Y 染色体上の *Dby*) を持つことが知られている (Vong et al 2006; Chang and Liu et al., 2010)。*D1Pas1* はイントロンを持たない単一エクソンの遺伝子であることから、*Ddx3x* の mRNA のから逆転写により挿入されたレトロポゾンであることが示唆されている (Sedlacek et al., 1999)。マウスのほかにもヒトやウシがこのレトロポゾンを持つことが知られている。ヒトの場合はタンパク質コード領域の途中に終始コドンを持つため機能的なタンパク質

をコードしていない偽遺伝子と考えられている (Kim et al., 2001)。ウシ精巣においては転写活性を持つことが報告されているが、機能的なタンパク質をコードしているかについての報告はまだなされていない (Liu et al., 2009)。

ヒトでの *DBY* 遺伝子の欠損は男性不妊を引き起こすことからヒト *DBY* は精子発生に必須であり、*DDX3X* では *DBY* の機能を補填できないことが示唆されている (Foresta et al., 2000)。一方でマウス精巣の場合は *Ddx3x*、*Dby* に加え *D1Pas1* が発現しており、*Dby* 遺伝子の欠損マウスにおいても少なくとも半数体の精子細胞まで精子発生が進行することが報告されている (Yamauchi et al., 2014)。そのため、マウス *Dby* 欠損は *D1Pas1* もしくは *Ddx3x* による補填が可能である可能性が考えられる。しかしながら、本研究において明らかとなった *D1Pas1* 欠損による表現型は、ヒト精巣における *DBY* 欠損による表現型と異なっていることから、ヒト *DDX3X* / *DBY* が担っている機能をマウス精巣では *Ddx3x* / *Dby* / *D1Pas1* の三つのタンパク質が担っている可能性が示唆された。

D1Pas1 マウスでは後期パキテン期精母細胞にはすべての精母細胞が精子発生を停止し、細胞死に至ることから、パキテン期のいずれかの時期に顕著な異常が起こっていることが考えられた。パキテン期精母細胞では、初期には相同染色体の対合が完了し、相同組み換えが起こることが知られている。また XY body と呼ばれる性染色体が凝縮した構造をつくり、転写の不活性化 (MSCI)

が起こることが知られている (Handel et al., 2004)。これらのいずれもが精子発生の進行に必須であり、各異常はパキテン期精母細胞での精子発生停止の原因となることが報告されている。しかしながら、*D1Pas1*^{-/-} 精母細胞でもいずれの現象も正常に起こっていた。このことから、*D1Pas1* が相同染色体の対合、相同組み換え、XY body の形成、MSCI に必須ではないことが示唆された。

D1Pas1 と同じく DEAD-box family に属する *Mvh* はレトロトランスポゾンの発現抑制に関与していることが近年報告された (Kuramochi-Miyagawa et al., 2010)。*D1Pas1* 欠損精巣においては、*Mvh* 機能欠損に見られるレトロトランスポゾン (LINE-1、SINE-B2、IAP) の過剰発現は RNA レベルでは見られず、LINE-1 タンパク質発現レベルも上昇は見られず、さらにレトロトランスポゾン領域の DNA 低メチル化に見られる脱抑制も見受けられなかった。これらのことから、*D1Pas1* は *Mvh* とは異なりレトロトランスポゾンの発現抑制には重要ではないことが示唆された。

DEAD-box family の RNA helicase はほぼすべての RNA 代謝に関与することが示唆されており (Linder and Jakowsky, 2011)、遺伝子発現の制御にも深く関与すると考えられる。そこでマイクロアレイ法により *D1Pas1*^{-/-} 精巣での遺伝子発現と野生型精巣の遺伝子発現を網羅的に調べ、*D1Pas1* 欠損による遺伝子発現への影響を調べた。*D1Pas1*^{-/-} 精巣で発現低下した遺伝子には精子発生関連

の遺伝子や精巣特異的遺伝子が多く含まれていることが示された。これらの遺伝子の中には円形精子細胞において発現する精子形成に関連する遺伝子も含まれており、*D1Pas1* 欠損による直接の影響に加え *D1Pas1*^{-/-} において精子発生が停止したことによる二次的な影響を受けていることが考えられる。*D1Pas1*^{-/-} 精巣で発現が上昇した遺伝子には免疫系の防御機構に関する遺伝子や遺伝子発現の正の制御に関連する遺伝子が多く含まれていた。*D1Pas1* のヒトのホモログである DDX3X はヒト免疫不全ウイルス (HIV) や C 型肝炎ウイルス (HCV) の標的となり、その感染に必要であることから、免疫機能に関与していることが報告されているため (Ariumi, 2013; Upadya et al., 2014)。*D1Pas1* も免疫機能への関与を検討する必要がある。*D1Pas1*^{-/-} 精巣においてバクテリアに対する防御機構に関連する α -defensin 2 や β -defensin 1, 10, 15 などの遺伝子の発現上昇は、*D1Pas1* の免疫機能への関与を示唆しているのかもしれない。また *D1Pas1* の欠損により遺伝子発現が低下したために、その補償作用として遺伝子発現の上昇に関連する遺伝子が発現上昇したのかもしれない。ヒト DDX3X は転写因子 SP1 と相互作用し転写活性化に関与する報告もなされている (Chao et al., 2006)。さらに、一般的な翻訳には必須ではないが、5'UTR を持つ mRNA や長い mRNA の効率的な翻訳に関与していることが示唆されている (Lai et al., 2008; Lai et al., 2010)。そのホモログである *D1Pas1* も、相互作用する転写因

子の検索あるいは特殊な翻訳の制御への関与の可能性を検討する必要がある。

精子発生過程において、減数分裂の前後、すなわち精母細胞と精子細胞では遺伝子発現状態が大きく異なることがよく知られているが、この遺伝子発現状態が精子細胞型へと切り替わる時期については近年まで詳細な解析はなかった。しかしながら、近年のマイクロアレイ法や次世代シーケンサによる RNA seq を用いた解析から、前期パキテン期精母細胞から遺伝子発現状態が精子細胞型へと移行することを示唆する報告が複数なされている (Waldman Ben-Asher et al., 2010; Fallahi et al., 2010; Cruz et al., 2016) が、この遺伝子発現状態の移行にかかわる機構はほとんど明らかでない。本研究における D1Pas1 を欠損した精巣において発現上昇を示す遺伝子の中には Sox2 や Myc といった未分化マーカーとして知られる転写因子も含まれていたこと、精子発生関連の遺伝子の顕著な発現低下していることから、D1Pas1 欠損により前期パキテン期から分化の進んだ精子細胞への遺伝子発現の移行に重要な役割を担っている可能性を示唆しているのかもしれない。

D1Pas1 のマウス精巣での重要性は以前から示唆されてきたが、これまでに詳細な解析はなされてこなかった。本研究では、D1Pas1 について初めて KO を作製し、その精子発生過程における必要性を初めて明らかにした。D1Pas1 は、相同染色体の対合、相同組み換え、MSCI 以外の重要な役割を担っていることが

示唆された。その機能は未だ不明瞭ではあるが、今後さらなる解析を進めることで、精巣における特異的な遺伝子発現制御機構に関して RNA 代謝の視点から新たな制御機構の知見を得られる可能性が期待できる。

引用文献

- Akiyama K, Noguchi J, Hirose M, Kajita S, Katayama K, Khalaj M, Tsuji T, Fairfield H, Byers C, Reinholdt L, Ogura A, Kunieda T, A mutation in the nuclear pore complex gene Tmem48 causes gametogenesis defects in skeletal fusions with sterility (sks) mice, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 31830–31841.
- Ariumi Y, Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection, *Front Genet.* 05 (2014) 423 1–10.
- Ashley T, Gaeth AP, Creemers LB, Hack AM, de Rooij DG, Correlation of meiotic events in testis sections and microspreads of mouse spermatocytes relative to the mid-pachytene checkpoint, *Chromosoma.* 113 (2004) 126–136.
- Barchi M, Geremia R, Magliozzi R, Bianchi E, Isolation and analyses of enriched populations of male mouse germ cells by sedimentation velocity: the centrifugal elutriation, *Methods Mol. Biol.* 558 (2009) 299–321.
- Becherel OJ, Yeo AJ, Stellati A, Heng EY, Luff J, Suraweera AM, Woods R, Fleming J, Carrie D, McKinney K, Xu X, Deng C, Lavin MF, Senataxin plays an essential role with DNA damage response proteins in meiotic recombination and gene silencing, *PLoS Genet.* 4 (2013) e1003435.

- Beckmann BM, Castello A, Medenbach J, The expanding universe of ribonucleoproteins: of novel RNA-binding proteins and unconventional interactions, *Pflugers Arch.* 468 (2016) 1029–1040
- Chang TC, Liu WS, The molecular evolution of PL10 homologs, *B.M.C. Evol. Biol.* 10 (2010) 127.
- Chao CH, Chen CM, Cheng PL, Shih JW, Tsou AP, Lee YH, DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor, *Cancer Res.* 66 (2006) 6579 – 6588
- Chen CY, Chan CH, Chen CM, Tsai YS, Tsai TY, Wu Lee YH, You LR, Targeted inactivation of murine Ddx3x: essential roles of Ddx3x in placentation and embryogenesis, *Hum. Mol. Genet.* in press.
- Chuma S, Nakano T, piRNA and spermatogenesis in mice, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368 (2013) 20110338
- da Cruz I, Rodríguez-Casuriaga R, Santiñaque FF, Farías J, Curti G, Capoano CA, Folle GA, Benavente R, Sotelo-Silveira JR, Geisinger A, Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage, *BMC Genomics.* 17 (2016) 294
- Dantzer F, Mark M, Quenet D, Scherthan H, Huber A, Liebe B, Monaco L, Chicheportiche A, Sassone-Corsi P, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J, Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male

- meiosis I and spermiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 14854–14859.
- Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH, The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 2333–2341.
- Dufau ML, Tsai-Morris C, Tang P, Khanum A, Regulation of steroidogenic enzymes and a novel testicular RNA helicase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 76 (2001) 187–197.
- Fallahi M, Getun IV, Wu ZK, Bois PR, A Global Expression Switch Marks Pachytene Initiation during Mouse Male Meiosis, *Genes (Basel).* 13 (2010) 469-483.
- Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A, Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility, *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (1999) 3660–3665.
- Foresta C, Moro E, Rossi A, Rossato M, Garolla A, Ferlin A, Role of the AZFa candidate genes in male infertility, *J. Endocrinol. Invest.* 23 (2000) 646–651.
- Foresta C1, Moro E, Ferlin A, Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, *Endocr Rev.* 22 (2001) 226–239.
- Fukuda T, Daniel K, Wojtasz L, Toth A, Höög C, A novel mammalian HORMA domain-containing protein, HORMAD1, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 158–171.

- Handel MA, The XY body: a specialized meiotic chromatin domain, *Exp. Cell Res.* 296 (2004) 57–63.
- Hatanaka Y, Inoue K, Oikawa M, Kamimura S, Ogonuki N, Kodama EN, Ohkawa Y, Tsukada Y, Ogura A, Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 14641–14646.
- Hu YC, Namekawa SH, Functional significance of the sex chromosomes during spermatogenesis, *Reproduction* 149 (2015) R265–277.
- Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y, A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing, *EMBO Rep.* 12 (2011) 267–275.
- Ishiguro K, Kim J, Shibuya H, Hernández-Hernández A, Suzuki A, Fukagawa T, Shioi G, Kiyonari H, Li XC, Schimenti J, Höög C, Watanabe Y, Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes, *Genes Dev.* 28 (2014) 594–607.
- Kim YS, Lee SG, Park SH, Song K, Gene structure of the human DDX3 and chromosome mapping of its related sequences, *Mol. Cells.* 12 (2001) 209–214.
- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin H, Matsuda Y, Nakano T, Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis, *Development.* 131 (2004) 839–849.

- Kuramochi-Miyagawa S1, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T, DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes, *Genes Dev.* 22 (2008) 908–917.
- Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, Nakano T, MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons, *Genes Dev.* 24 (2010) 887–892.
- Lai MC, Lee YH, Tarn WY, The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control, *Mol Biol Cell.* 19 (2008) 3847–3858.
- Lai MC, Chang WC, Shieh SY, Tarn WY, DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1, *Mol Cell Biol.* 30 (2010) 5444–5453.
- Laiho A, Kotaja N, Gyenesi A, Sironen A, Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis, *PLoS One.* 8 (2013) e61558.
- Leroy P, Alzari P, Sassoon D, D. Wolgemuth, M. Fellous, The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase, *Cell* 57 (1989) 549–559.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP, Birth of the D-E-A-D box, *Nature.* 337 (1989) 121–122.

- Linder P, Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 4168–4180.
- Linder P, Jankowsky E, From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 505–516.
- Liu WS, Wang A, Yang Y, Chang TC, Landrito E, Yasue H, Molecular characterization of the DDX3Y gene and its homologs in cattle, *Cytogenet Genome Res.* 126 (2009) 318–328.
- Matzuk MM, Lamb DJ, The biology of infertility: research advances and clinical challenges, *Nat. Med.* 14 (2008) 1197–1213.
- Mazeyrat S, Saut N, Grigoriev V, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Rattigan A, Bishop C, Eicher EM, Mitchell MJ, Burgoyne PS, A Y-encoded subunit of the translation initiation factor Eif2 is essential for mouse spermatogenesis, *Nat. Genet.* 29 (2001) 49–53.
- Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM, Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* in press.
- Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC, Turner JM, The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression, *Nat Genet.* 40 (2008) 794–799.

- Mueller JL, Skaletsky H, Brown LG, Zaghul S, Rock S, Graves T, Auger K, Warren WC, Wilson RK, Page DC, Independent specialization of the human and mouse X chromosomes for the male germ line, *Nat Genet.* 45 (2013) 1083–1087.
- Nakanishi Y, Shiratsuchi A, Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 13–16.
- Pacchierotti F, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U, Mailhes JB, Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells, *Environ. Res.* 104 (2007) 46–69.
- Page J, de la Fuente R, Manterola M, Parra MT, Viera A, Berríos S, Fernández-Donoso R, Rufas JS, Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma.* 121 (2012) 307–326.
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P, A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline, *Chromosome Res.* 5 (1997) 66–68.
- Rauschendorf MA, Zimmer J, Ohnmacht C, Vogt PH, DDX3X, the X homologue of AZFa gene DDX3Y, expresses a complex pattern of transcript variants only in the male germ line, *Mol. Hum. Reprod.* 20 (2014) 1208–1222.
- Roeder GS, Meiotic chromosomes: it takes two to tango, *Genes Dev.* 11 (1997) 2600–2621.

- Russell LD, Ettlin RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED, Histological and Histopathological Evaluation of Testis, Cache River Press, St. Louis, MO, USA, 1990.
- Sedlacek Z, Münstermann E, Dhorne-Pollet S, Otto C, Bock D, Schütz G, Poustka A, Human and mouse XAP-5 and XAP-5-like (X5L) genes: identification of an ancient functional retroposon differentially expressed in testis, *Genomics* 61 (1999) 125–132.
- Session DR, Lee GS, Wolgemuth DJ, Characterization of D1Pas1, a mouse autosomal homologue of the human AZFa region DBY, as a nuclear protein in spermatogenic cells, *Fertil Steril.* 76 (2001) 804–811.
- Sheng Y, Tsai-Morris CH, Gutti R, Maeda Y, Dufau ML, Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) is a transport protein involved in gene-specific mRNA export and protein translation during spermatogenesis, *J Biol Chem.* 281 (2006) 35048–35056.
- Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD, The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis, *Biol Reprod.* 71 (2004) 319–330.
- Shin YH, Choi Y, Erdin SU, Yatsenko SA, Kloc M, Yang F, Wang PJ, Meistrich ML, Rajkovic A, Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1001190.
- Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, Hata K, Martin SL, Noce T,

- Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sasaki H, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S, The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline, *Dev. Cell.* 17 (2009) 775–787.
- Sun F, Palmer K, Handel MA, Mutation of Eif4g3, encoding a eukaryotic translation initiation factor, causes male infertility and meiotic arrest of mouse spermatocytes, *Development.* 137 (2009) 775–787.
- Upadya MH, Aweya JJ, Tan YJ, Understanding the interaction of hepatitis C virus with host DEAD-box RNA helicases, *World J Gastroenterol.* 20 (2014) 2913–2926.
- Vong QP, Li Y, Lau YF, Dym M, Rennert OM, Chan WY, Structural characterization and expression studies of Dby and its homologs in the mouse, *J. Androl.* 27 (2006) 653–661.
- Waldman Ben-Asher H, Shahar I, Yitzchak A, Mehr R, Don J, Expression and chromosomal organization of mouse meiotic genes, *Mol Reprod Dev.* 77 (2010) 241–248.
- Yamauchi Y, Riel JM, Stoytcheva Z, Ward MA, Two Y genes can replace the entire Y chromosome for assisted reproduction in the mouse, *Science* 343 (2014) 69–72.
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ, Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis, *J. Cell Biol.* 173 (2006) 497–507.

Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ, Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis, *J. Cell. Biol.* 180(2008) 673–679.

謝辞

本論文は筆者が東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士後期課程に在籍中の研究経過をまとめたものである。本稿を終えるにあたり、本研究を通じて終始懇切なご指導を賜りました理化学研究所バイオリソースセンター、遺伝工学基盤技術室の小倉淳郎先生、学部4年生で研究室配属されて以来大変お世話になりました東北大学動物生殖科学分野の種村健太郎教授、本論文を査読頂きご助言を賜りました東北大学機能形態学分野の麻生久教授、動物栄養生化学分野の豊水正昭教授に深く感謝の意を表します。本論文をご精読頂き有用なご助言を頂きました原健士朗准教授に心より御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり終始、ご指導、ご協力を賜りました理化学研究所バイオリソースセンター、遺伝工学基盤技術室の井上貴美子先生、越後貫成美専任技師、畑中勇輝博士、廣瀬美智子技師、的場章悟博士、実験動物の管理および系統維持にご協力を賜りました同室の持田慶司専任技師、長谷川歩未技師、富島俊子技師に心より感謝いたします。本論文作成に当たり、審査委員として多くのご助言を頂きました東北大学機能形態学分野の野地智法准教授、動物整理科学分野の盧尚建准教授、動物微生物学分野の米山裕准教授に心より御礼申し上げます。本研究の第二章の実験では農業・食品産業技術総合研究機構の野口純子先生に、第三章の実験では京都大学ウィルス・再生医科学研究所の中馬新一郎准教授に資

料を提供していただくとともに有益なご助言を頂きました、ここに感謝の意を表します。ノックアウトマウス作出ならびに表現型の解析に際しまして理化学研究所バイオリソースセンター、マウス表現型解析開発チーム、若菜茂晴先生、小林喜美男技師に多大なご協力を賜りました、ここに感謝の意を表します。

本研究の一部は理化学研究所、大学院生リサーチアソシエイト、日本学術振興会、特別研究員（DC2）の研究補助金によります。

图表

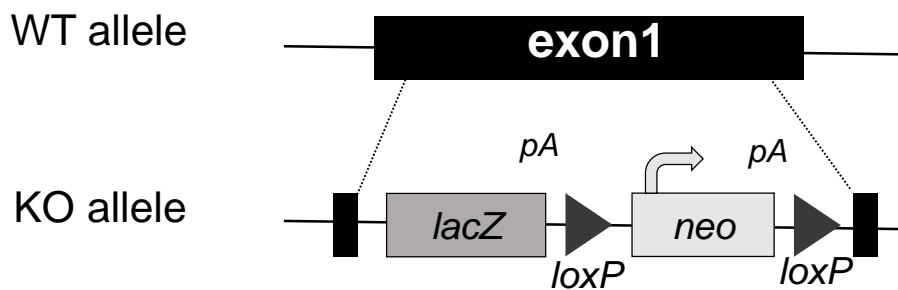


図1. *D1Pas1* KOアリのコンストラクト

D1Pas1 KOアリでは翻訳が開始する最初のメチオニンの前から終止コドンの直前までの配列を*LacZ*(β -Galactocidaseをコード)と薬剤耐性遺伝子のネオマイシン(*neo*)を含む配列に置き換えた。

表1. *D1Pas1* KOマウスの妊性試験

性別	遺伝子型	妊娠率
雌	+/-	100 % (n = 3)
	-/-	87.5 % (n = 8)
雄	+/-	100 % (n = 5)
	-/-	0 % (n = 6)

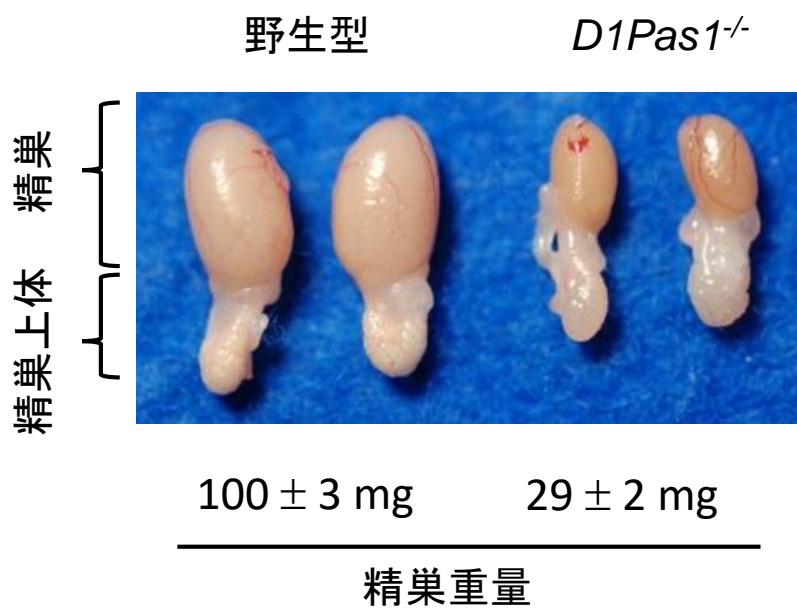


図2. *D1Pas1* KO マウス精巢 および 野生型マウス精巢とその重量
 摘出したマウス精巢と精巢上体。精巢のみの重量を下に示す。
 (平均値 ± 標準偏差)

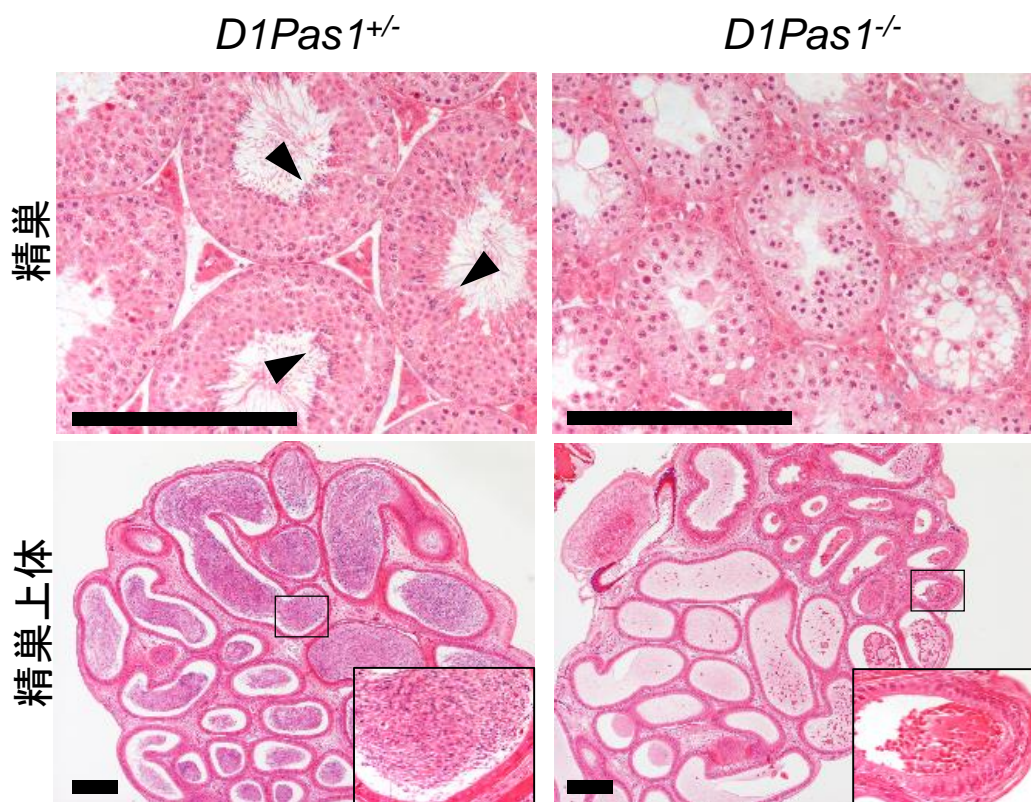


図3. *D1Pas1*^{+/-} および *D1Pas1*^{-/-} マウスの精巣、精巣上部のHE染色像
D1Pas1^{+/-} マウスにおいてはヘマトキシリンで濃く染色される伸長精子細胞(精巣、矢頭)および精子(精巣上部)が観察されるが、*D1Pas1*^{-/-} マウス精巣、精巣上部では観察されない。*D1Pas1*^{-/-} マウス精巣上部ではエオシン陽性の好酸性の死細胞が観察された。スケールバーは200 μ m を示す。

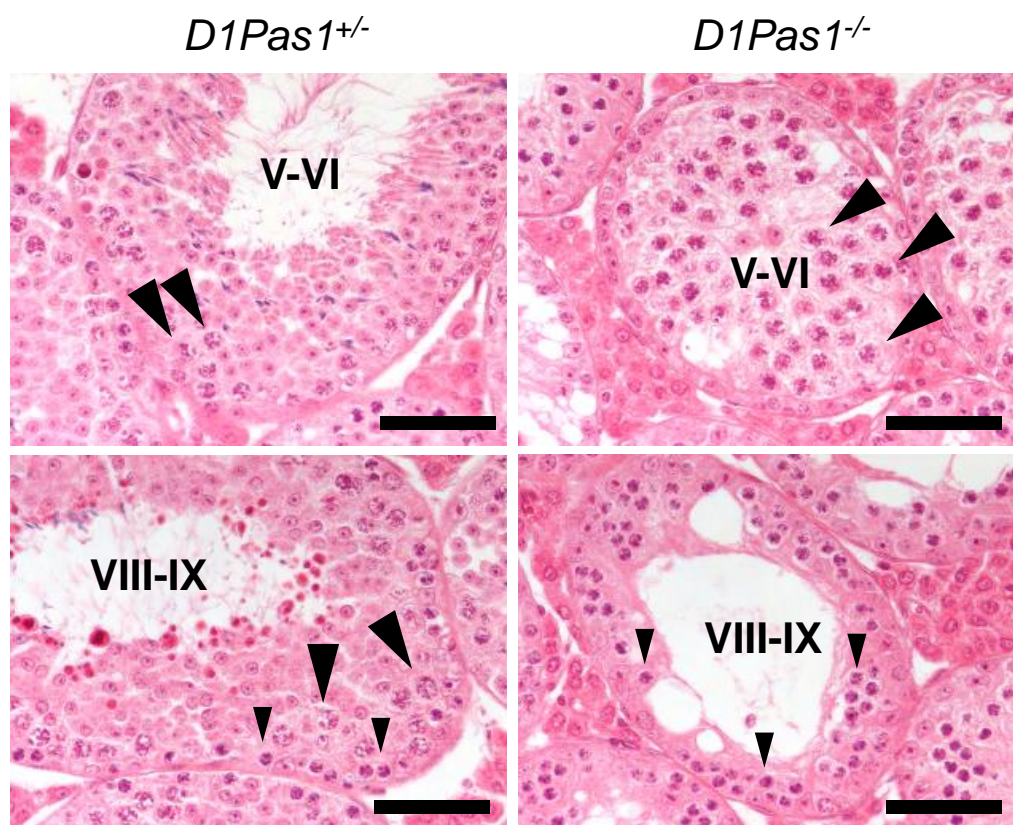


図4. $D1Pas1^{+/-}$ および $D1Pas1^{-/-}$ マウスの精巣の HE 染色像

stage V – VI の精細管では $D1Pas1^{-/-}$ 精巣においてもパキテン期精母細胞(大矢頭)が観察されるが、stage VIII – IX の精細管ではレプトテン期精母細胞(小矢頭)は観察されるもののパキテン期精母細胞は観察されなかった。大矢頭でパキテン期精母細胞を、小矢頭でレプトテン期精母細胞を示した。管腔内のローマ数字で stage を示した。 スケールバーは 50 μm を示す。

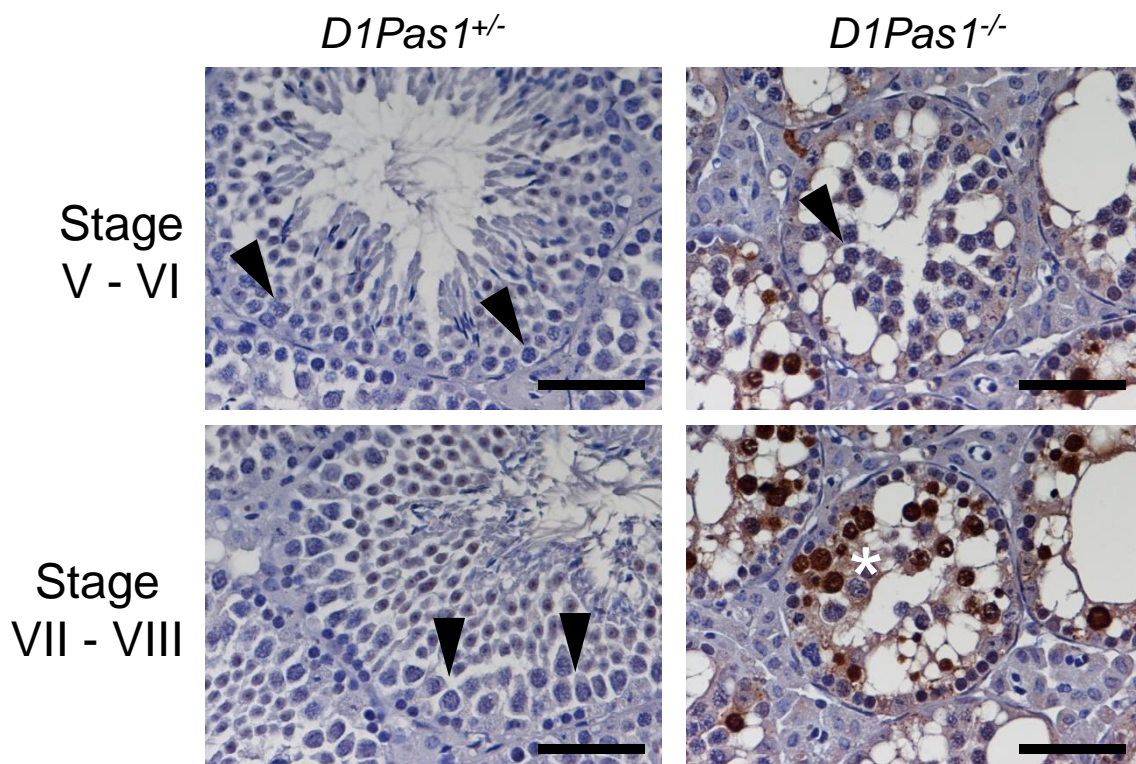


図5. $D1Pas1^{+/-}$ および $D1Pas1^{-/-}$ マウスの精巣の TUNEL 染色

stage V – VI の精細管では $D1Pas1^{-/-}$ 精巣においては生存したパキテン期精母細胞 (矢頭) が観察されるが、死亡した精母細胞は観察されなかった。stage VII – VIII の精細管では細胞死を引き起こしたパキテン期精母細胞 (アスタリスク) が多数観察された。矢頭でパキテン期精母細胞を示した。

スケールバーは 50 μm を示す。

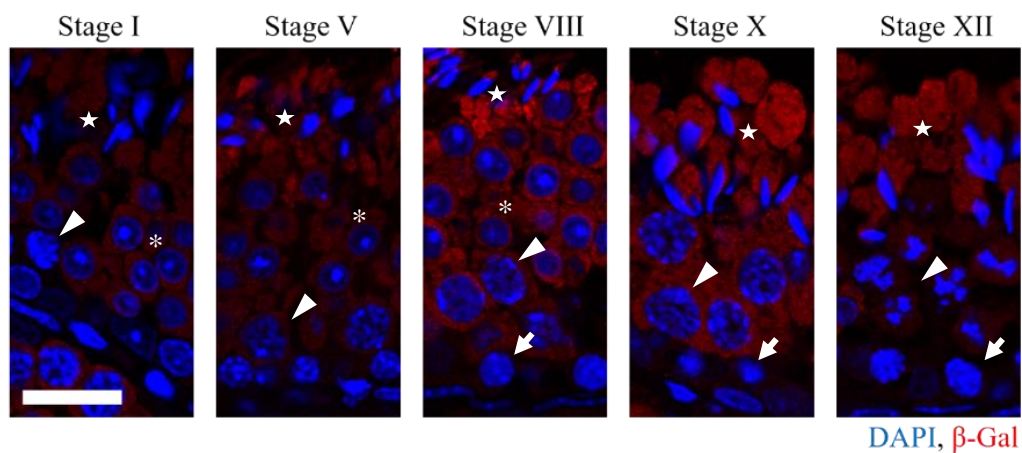


図6. *D1Pas1*^{+/-} 精巣における β - Gal の免疫蛍光染色

stage I のパキテン期精母細胞(矢頭)では β - Gal のシグナルは観察されなかったが、stage V のパキテン期精母細胞から β - Gal の赤いシグナルが観察され、以降 stage VIII の伸長精子細胞(星印)step 16 までシグナルが観察された。矢印でレプトテン期精母細胞(stage VIII, X)およびザイゴテン期精母細胞(stage XII)を、矢頭でパキテン期精母細胞(stage I – X)および二次精母細胞(stage XII)を、アスタリスクで円形精子細胞を、星印で伸長精子細胞をそれぞれ示している。 β - Gal のシグナルを赤で、DAPI のシグナルを青で示した。 β - Gal はstage V のパキテン期精母細胞(矢頭)からシグナルがみられ、stage VIII の伸長精子細胞(星印)までシグナルは検出された。スケールバーは 20 μ m を示す。

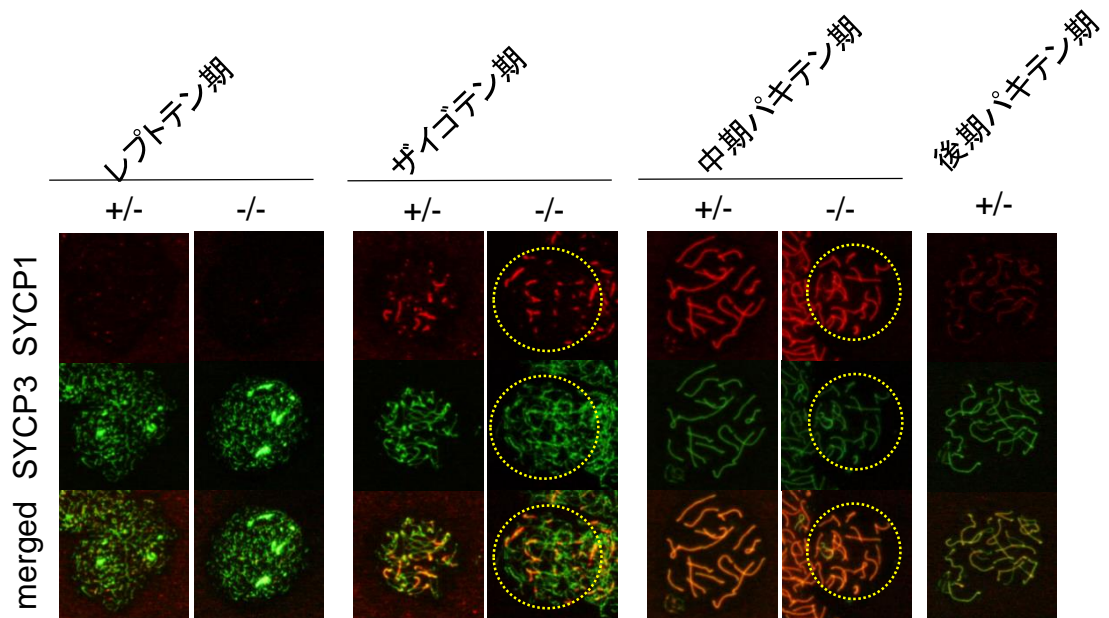
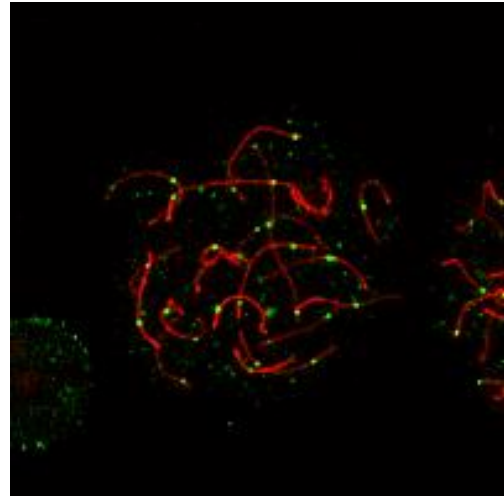
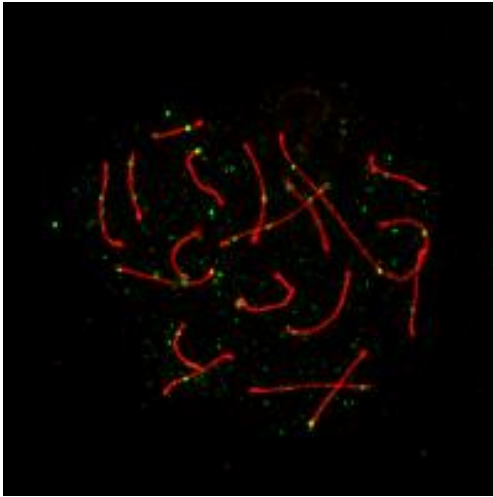


図7. Chromosome spread 法を用いた精母細胞の SYCP1, 3 の免疫染色

レプトテン期、サイゴテン期、中期パキテン期、後期パキテン期における SYCP1、SYCP3の局在を示した。*D1Pas1*^{-/-} 精母細胞においても正常な SYCP1 および 3 の局在、レプトテン期における SYCP3 の局在、サイゴテン期における SYCP1 局在にみられる対合の開始、中期パキテン期における対合の完了、が観察された。*D1Pas1*^{-/-} においては後期パキテン期精母細胞は認められなかった。赤いシグナルで SYCP1 を、緑のシグナルで SYCP3 をそれぞれ示した。黄色い破線で一つの細胞の範囲を表した。

野生型

D1Pas1 ^{-/-}



Mlh1, SYCP1

	野生型	<i>D1Pas1</i> ^{-/-}
平均 (fociの数)	25.0	20.2
標準偏差	3.9	4.8

図8. Chromosome spread 法を用いた精母細胞の SYCP1, Mlh1の免疫染色および Mlh1 foci の数
 パキテン期精母細胞における、SYCP1 と Mlh1 の局在を示した。赤いシグナルで SYCP1 を、緑のシグナルで Mlh1 をそれぞれ示した。核細胞核あたりの Mlh1 の foci の数の平均と標準偏差を下の表に示した。

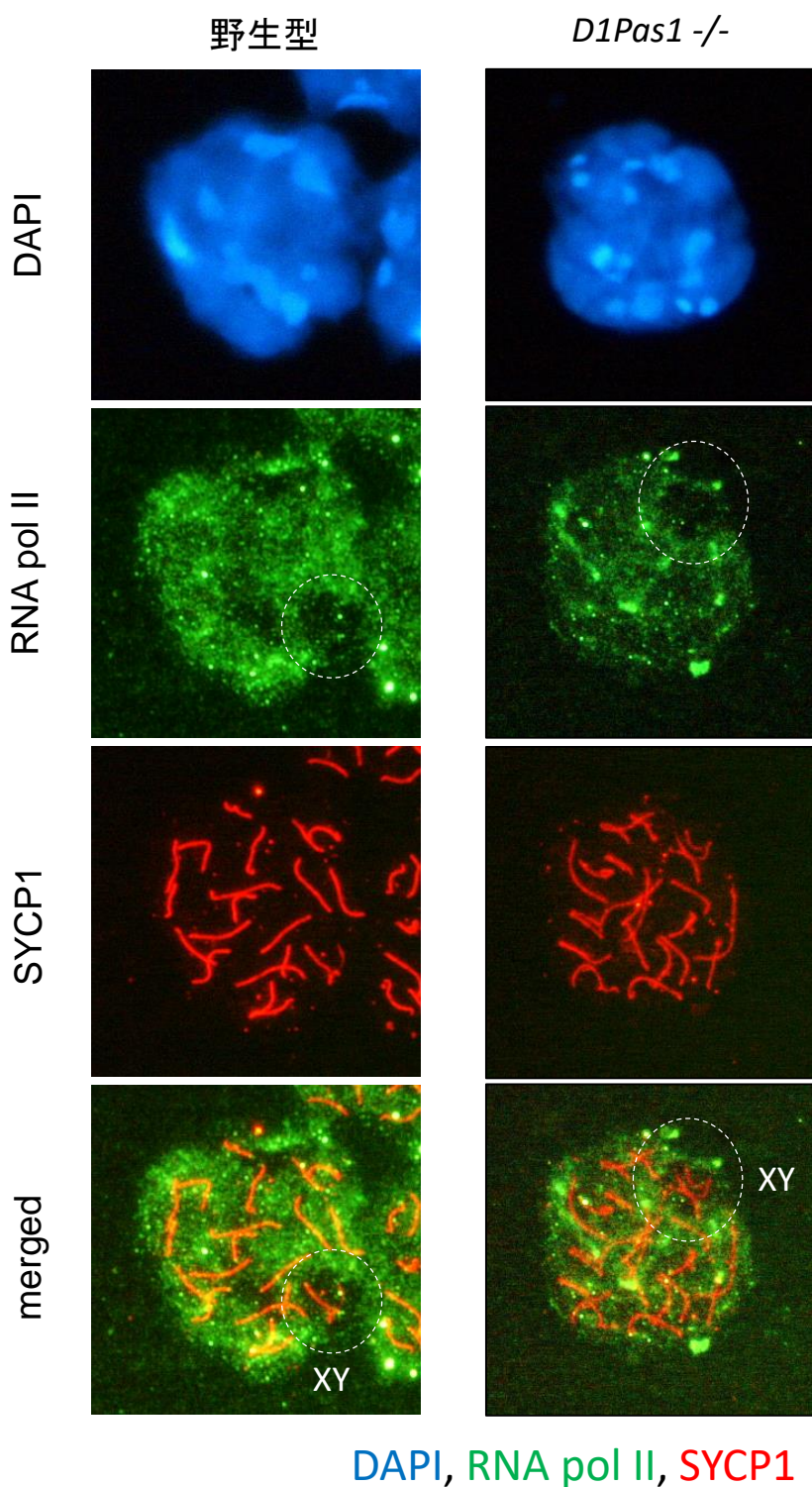


図9. Chromosome spread 法を用いた精母細胞の SYCP1, RNAPol II の免疫染色
 パキテン期精母細胞における SYCP1 および RNA polymerase II の局在を示した。
 緑のシグナルで RNA polymerase II を、赤いシグナルで SYCP1 を、青いシグナルで
 DAPI による核染色を示した。白い破線で XY body の位置を示した。

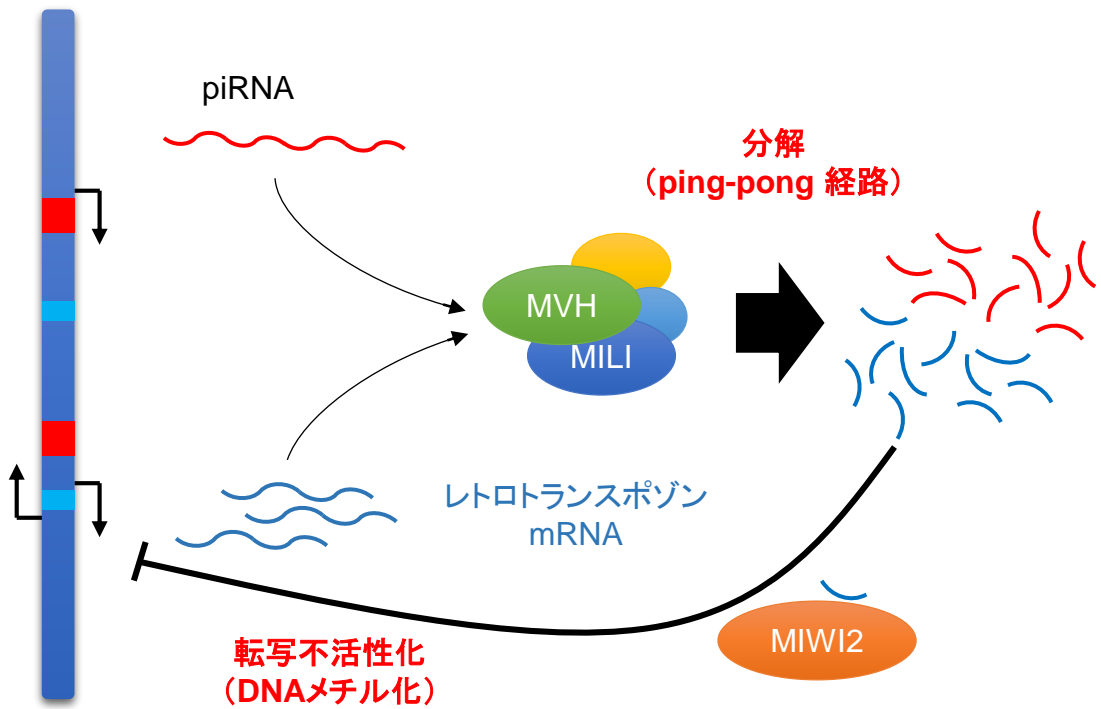


図10. Mvh によるレトロトランスポゾン抑制制御(模式図)

Mvh は MILI などと複合体を形成し、piRNA と結合し ping - pong 経路によりレトロトランスポゾン RNA の分解を行っている。分解産物は MIWI2 によりリクルートされ、レトロトランスポゾン領域の DNA メチル化を促進する。

(Chuma and Nakano, 2013)

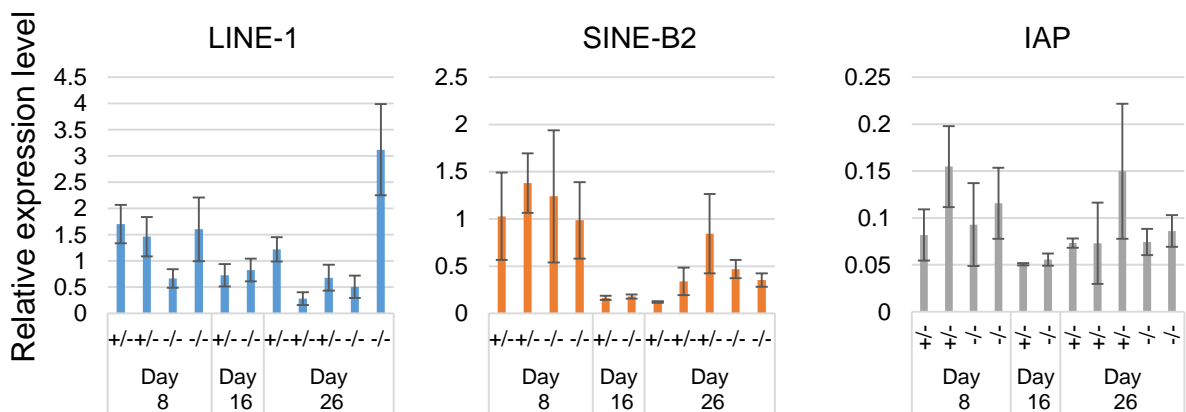


図11. D1Pas1^{+/-} 精巣およびD1Pas1^{-/-} 精巣における

レトロトランスポゾンmRNA発現解析

生後8日、16日、26日におけるLINE-1、SINE-B2、IAP の RNA の発現量を示した。縦軸に β - actin の発現量に対する対象遺伝子の発現量を示した。標準偏差をエラーバーで示した。いずれの日齢においてもレトロトランスポゾンmRNA発現レベルに有意な差はなかった。

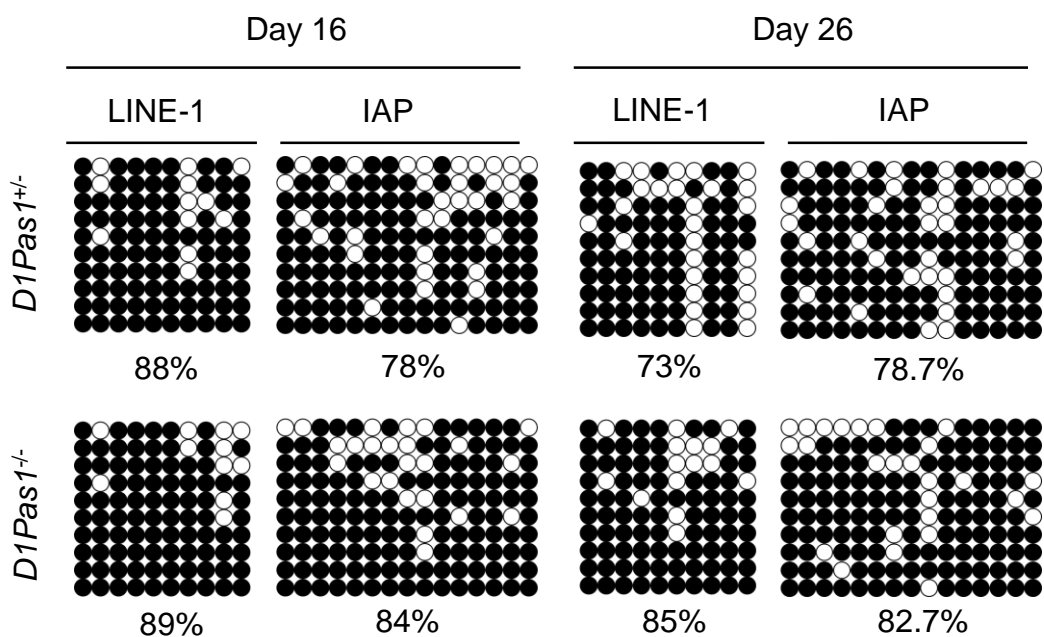


図12. バイサルファイトシーケンシングによるDNAメチル化修飾解析

生後16日、26日齢の精巣における LINE-1、IAP 領域の DNA メチル化修飾をバイサルファイトシーケンシングにより調べた。一つの円で一か所のメチル化サイト(CpG site)を示し、黒い円でメチル化修飾を受けた CpG site を、白い円でメチル化されていないCpG site を示した。また、メチル化サイト全体に対するメチル化を受けた CpG site をパーセンテージで示した。

D1Pas1^{-/-} においても *D1Pas1*^{+/-} と同程度のメチル化の蓄積がみられた。

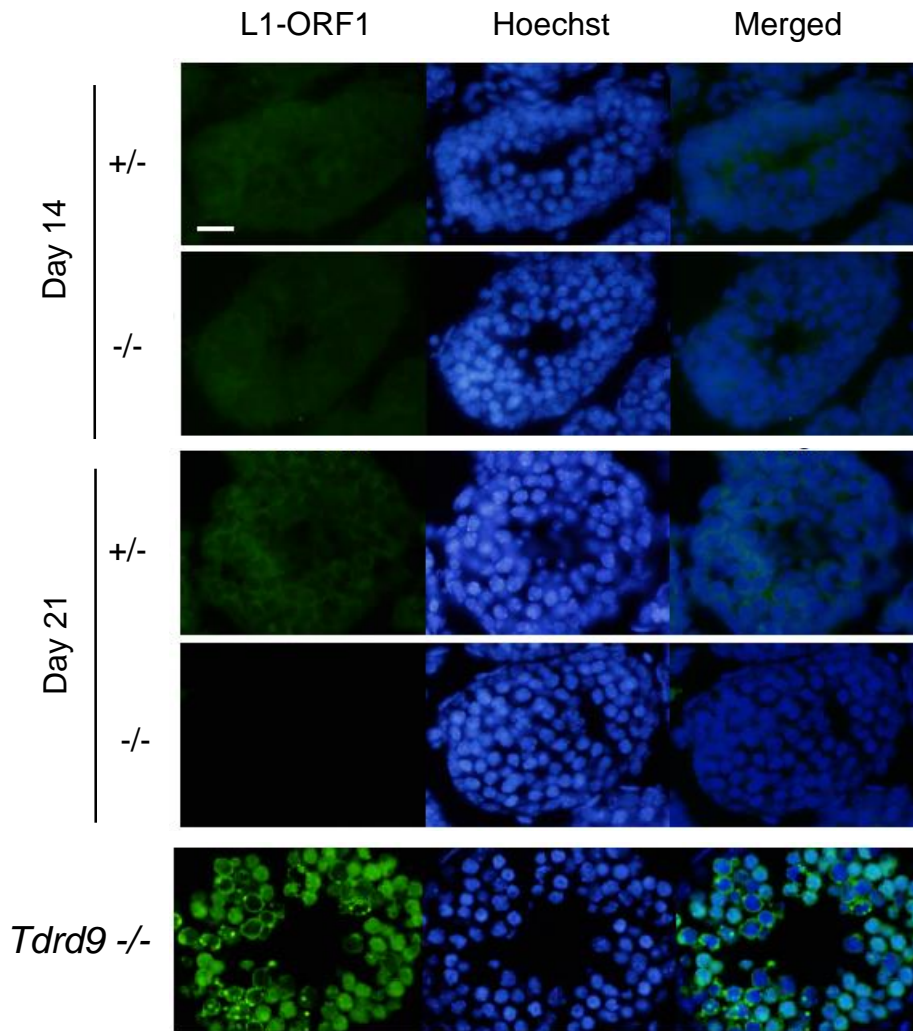
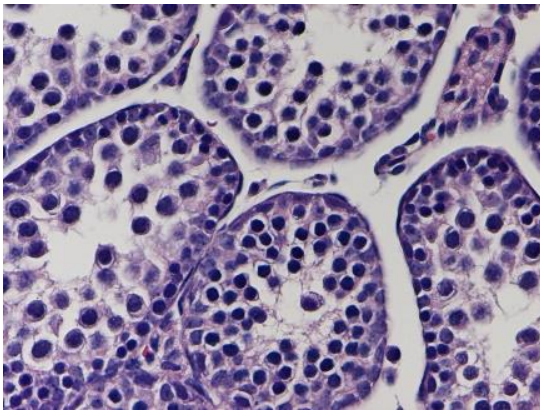


図13. 免疫蛍光染色による LINE-1 (L1-ORF1)の局在解析

生後14日、21日齢の精巢における LINE-1 タンパク質(L1-ORF1)の局在を示した。また、L1-ORF1 過剰発現のポジティブコントロールとして *Tdrd9* $-/-$ 精巢の局在も示した(Shoji et al., 2009)。 *D1Pas1* $-/-$ 精巢においてもL1-ORF1の過剰発現は認められなかった。緑のシグナルで L1-ORF1 を、青のシグナルでヘキストを示した。 Scale bar = 20 μ m

野生型



D1Pas1 ^{-/-}

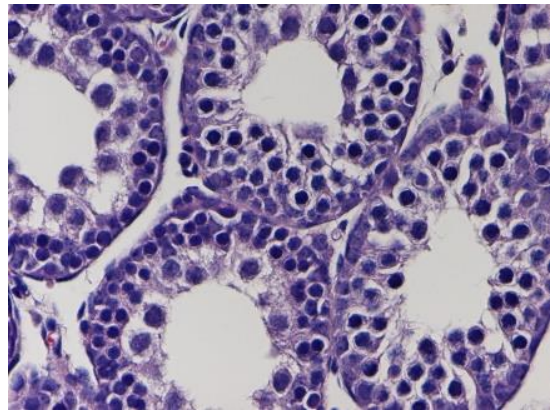


図14. 18日齢マウス精巣 HE 染色像

マイクロアレイ解析に用いたマウスのうち、一個体からマイクロアレイ解析に用いた反対側の精巣を染色した。野生型と*D1Pas1*^{-/-} 精巣では精細胞の発生ステージに大きな差は見られなかった。

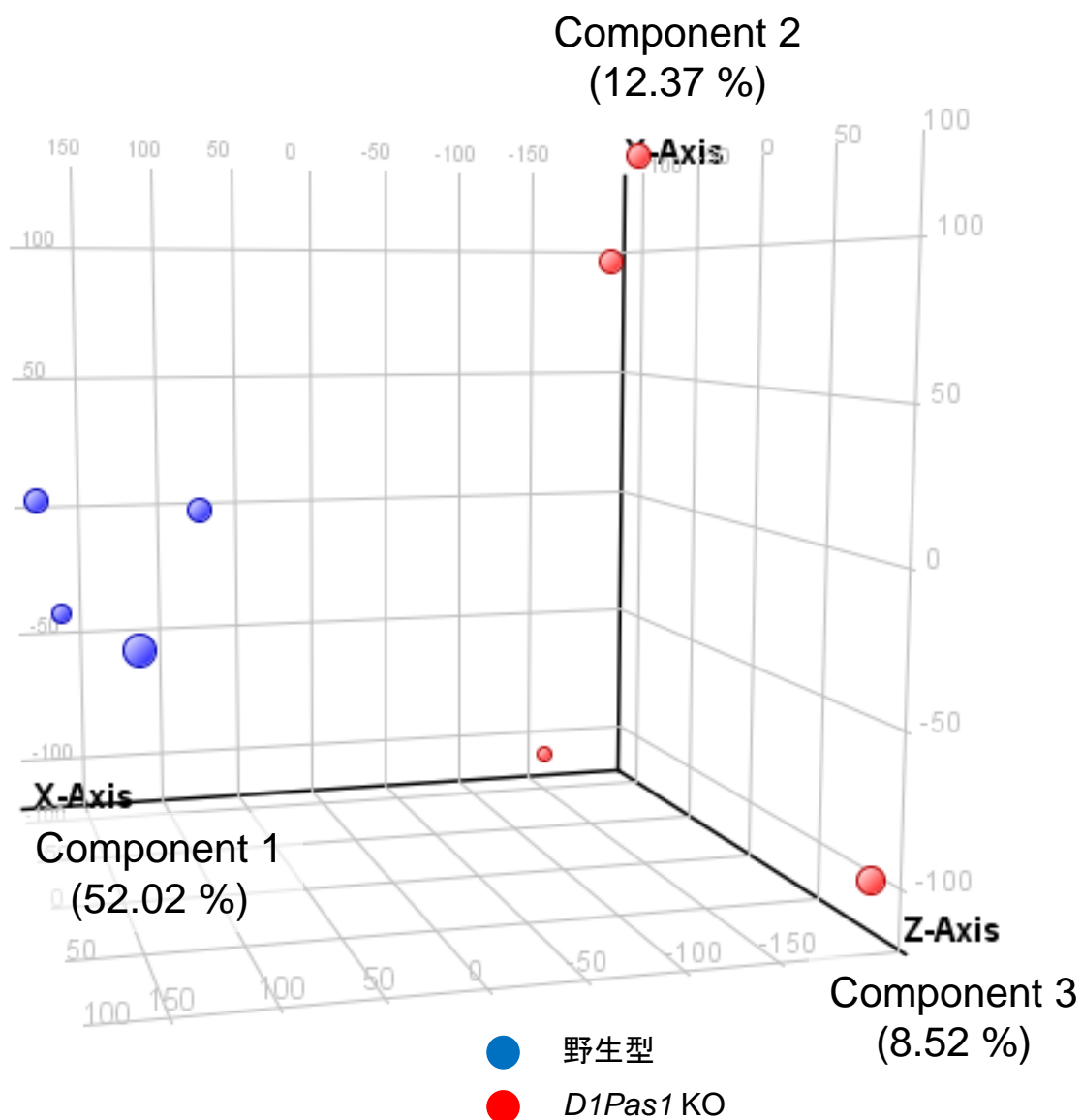


図15. 遺伝子発現プロファイルによる主成分解析

マイクロアレイによる遺伝子発現のプロファイルから各サンプル間でどれくらいの差異があるのか主成分解析を行った。野生型精巢の遺伝子発現プロファイルは *D1Pas1*^{-/-} 精巢のプロファイルと最も寄与率の高い Component 1, 2 により明確に区分された。また *D1Pas1*^{-/-} 精巢プロファイルは Component 2, 3 でサンプル間で区分されることから、サンプル間にばらつきがあることが示唆された。

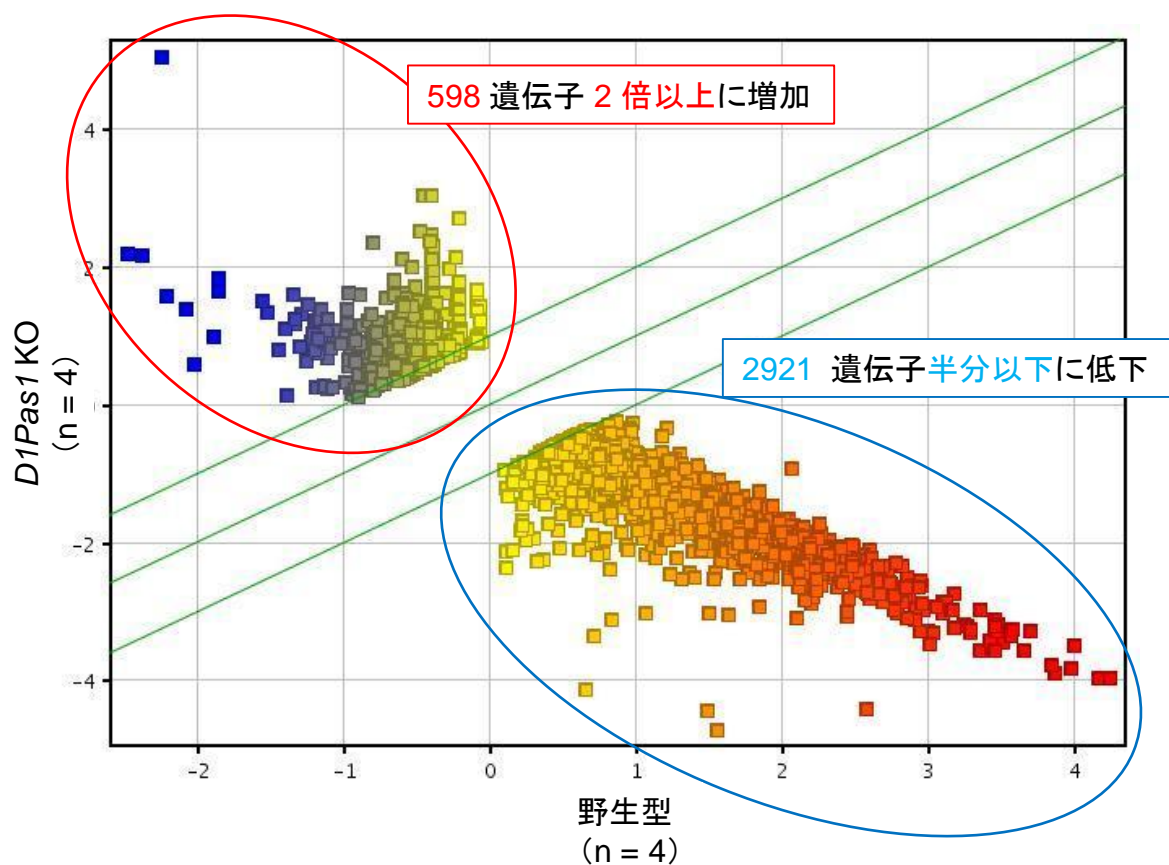


図16. 各遺伝子の発現量を示す散布図

縦軸に *D1Pas1*^{-/-} 精巣での正規化後の発現量を、横軸に野生型精巣での正規化後の発現量を取り、各遺伝子プローブのうち野生型と *D1Pas1*^{-/-} 精巣で発現量が2倍以上有意に (t-test) 変化したもののみをプロットした。2倍以上に増加していたものは 598 遺伝子、2分の1以下に低下していたものは 2921 遺伝子あった。

**表2. *D1Pas1*^{-/-} 精巢において発現が低下していた遺伝子のうち
発現量の差が大きいものの上位20 遺伝子**

GeneSymbol	GeneName	Fold change
Toporsl	topoisomerase I binding, arginine/serine-rich like	290.5
Ccdc178	coiled coil domain containing 178	276.8
Prss39	protease, serine 39	219.4
4930589P08Rik	RIKEN cDNA 4930589P08 gene	213.0
4930449C09Rik	RIKEN cDNA 4930449C09 gene	193.8
Gm7135	predicted gene 7135	175.4
GalntI6	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6	145.3
Gm34285	predicted gene, 34285	127.6
1700026J12Rik	RIKEN cDNA 1700026J12 gene	124.0
Ccdc178	coiled coil domain containing 178	124.0
4930474M22Rik	RIKEN cDNA 4930474M22 gene	121.4
1700008F21Rik	RIKEN cDNA 1700008F21 gene	121.4
1700017G19Rik	RIKEN cDNA 1700017G19 gene	119.1
Cmtm2b	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2B	117.2
Abca15	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 15	116.1
LOC102633266	uncharacterized LOC102633266	112.6
1700051A21Rik	RIKEN cDNA 1700051A21 gene	111.9
Gm34265	predicted gene, 34265	105.2
Ccdc110	coiled-coil domain containing 110	100.0
4930543D07Rik	RIKEN cDNA 4930543D07 gene	99.7

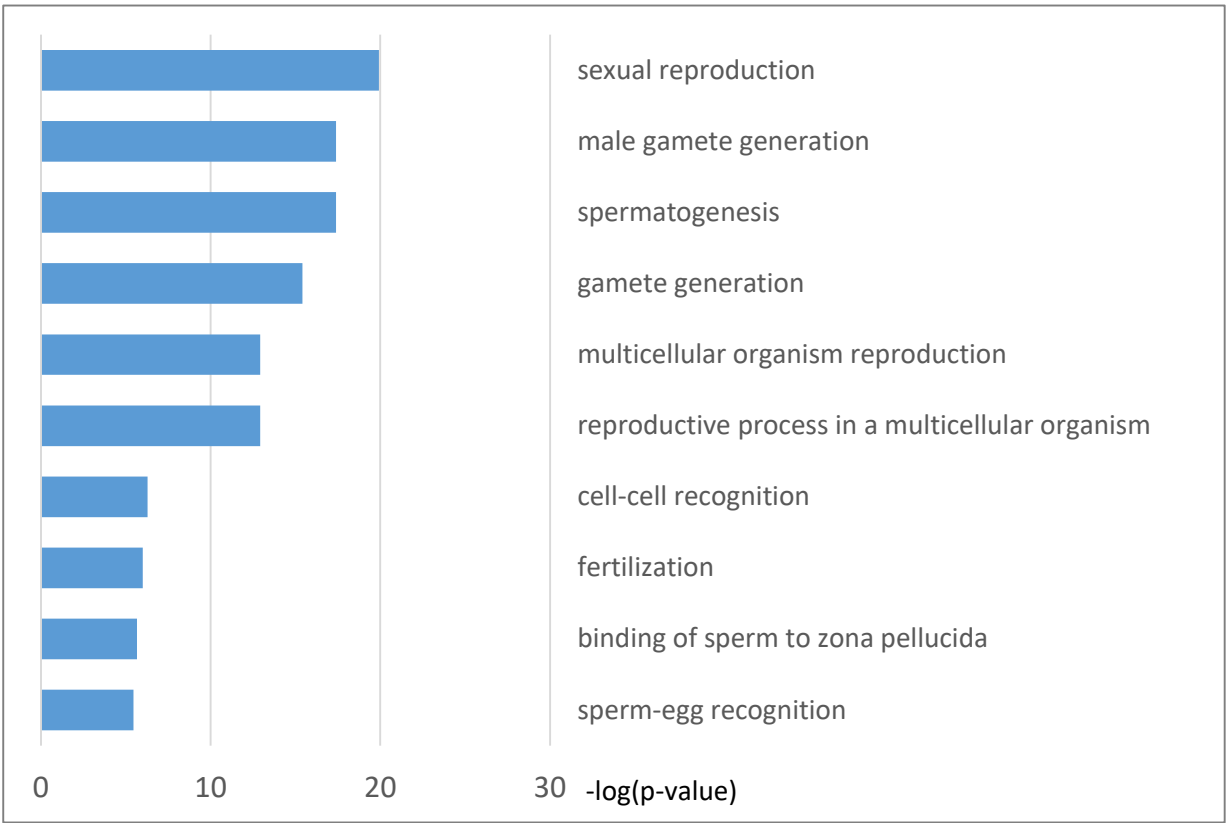


図17. *D1Pas1*^{-/-} 精巢において発現量が低下していた遺伝子に対するGene Ontology 解析
p値の低い順に上位10 term を示した。特にp値の低い6 term は生殖、精子発生に関連する term だった。

**表3. *D1Pas1*^{-/-} 精巣において発現が上昇していた遺伝子のうち
発現量の差が大きいものの上位20 遺伝子**

GeneSymbol	GeneName	Fold change
Crisp3	cysteine-rich secretory protein 3	161.42
Cypt1	cysteine-rich perinuclear theca 1	26.18
Cypt9	cysteine-rich perinuclear theca 9	23.84
Gm16430	predicted gene 16430	14.15
Slxl1	Slx-like 1	11.68
Gm33693	predicted gene, 33693	11.66
Gm4836	predicted gene 4836	11.38
Olfr698	olfactory receptor 698	11.09
Cypt7	cysteine-rich perinuclear theca 7	8.58
4930467J12Rik	RIKEN cDNA 4930467J12 gene	7.83
Gm33638	predicted gene, 33638	7.50
Lcn5	lipocalin 5	7.14
Defb1	defensin beta 1	6.81
Spr2a2	small proline-rich protein 2A2	6.70
Cacna1c	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	6.33
Spag11a	sperm associated antigen 11A	6.12
Adam7	a disintegrin and metallopeptidase domain 7	6.06
Gm35137	predicted gene, 35137	5.94
C4bp	complement component 4 binding protein	5.87
Egr3	early growth response 3	5.85

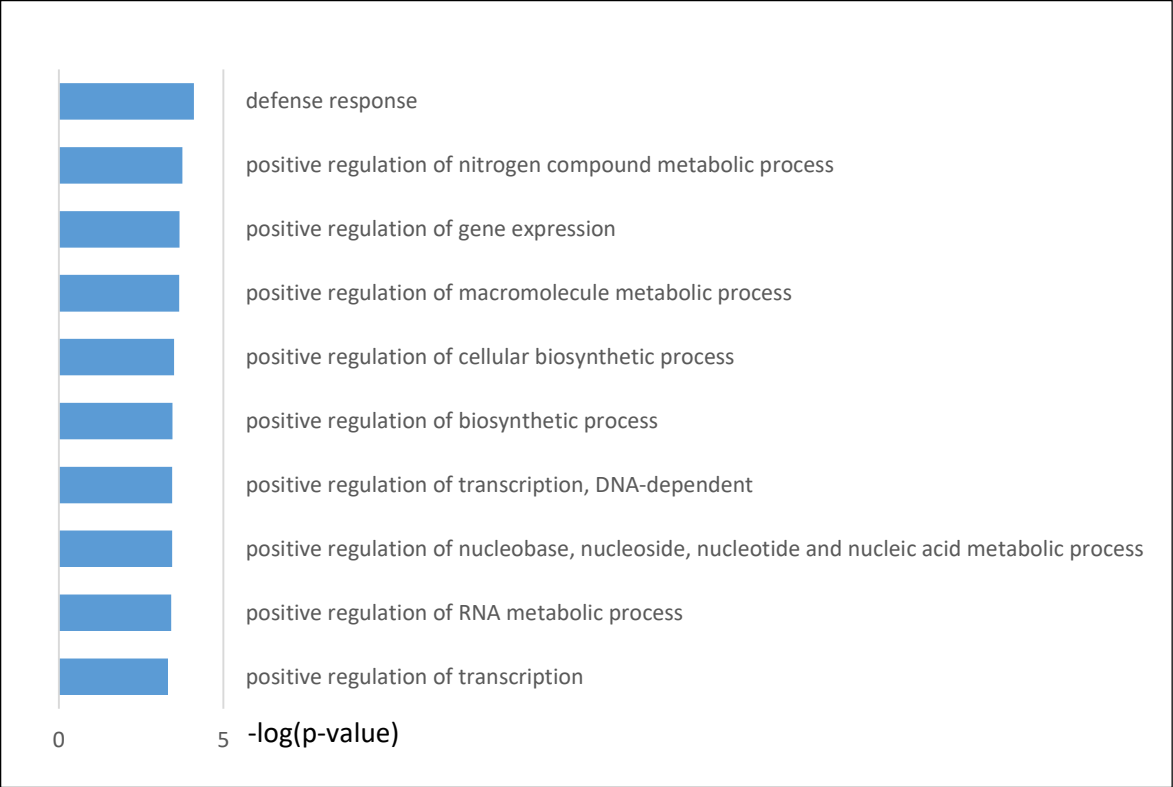


図18. *D1Pas1*^{-/-} 精巣において発現量が上昇していた遺伝子に対するGene Ontology 解析
p値の低い順に上位10 term を示した。顕著にp値の低いterm はなかったものの遺伝子発現の正の制御に関連するものが複数含まれていた。

表4. A *D1Pas1*^{-/-} 精巢において発現が上昇していた遺伝子のうち
X 染色体上に存在する遺伝子

GeneSymbol	GeneName or Description	Fold Change
Cypt1	cysteine-rich perinuclear theca 1	26.18
Cypt9	cysteine-rich perinuclear theca 9	23.84
Gm16430	predicted gene 16430	14.15
	lincRNA:chrX:121032646-121038407 reverse strand	13.22
Slxl1	Slx-like 1	11.68
Gm4836	predicted gene 4836	11.38
		7.86
	predicted pseudogene 5123	7.47
	lincRNA:chrX:120353972-120361170 reverse strand	6.63
	lincRNA:chrX:120590872-120598071 reverse strand	6.24
	predicted gene, 17467	6.24
	lincRNA:chrX:121493684-121500532 forward strand	6.15
	lincRNA:chrX:122623597-122630826 forward strand	5.99
Gm9059	predicted gene 9059	5.48
Cypt2	cysteine-rich perinuclear theca 2	5.47
	predicted gene 16428	5.24
	lincRNA:chrX:120562611-120780555 reverse strand	5.04
	predicted gene 14676	4.94
Fam122c	family with sequence similarity 122, member C	4.83
6530403M18Rik	RIKEN cDNA 6530403M18 gene	4.83
Gm2030	predicted gene 2030	4.72
Prame	preferentially expressed antigen in melanoma	4.56
	lincRNA:chrX:122648893-122652122 forward strand	4.52
Cypt3	cysteine-rich perinuclear theca 3	4.50
	lincRNA:chrX:120324027-120326909 reverse strand	4.48
Gm17577	predicted gene, 17577	4.46
Gm9	predicted gene 9	4.41
	lincRNA:chrX:121520904-121524132 forward strand	4.40
Gm10487	predicted gene 10487	4.22
	lincRNA:chrX:120324027-120326909 reverse strand	4.11
	lincRNA:chrX:120324027-120326909 reverse strand	4.10
	lincRNA:chrX:121004130-121007360 reverse strand	4.07

アノテーションのない遺伝子(プローブ)は空白で示した。

表4. B *D1Pas1*^{-/-} 精巣において発現が上昇していた遺伝子のうち
X 染色体上に存在する遺伝子

GeneSymbol	GeneName or Description	Fold Change
4930557B15Rik	RIKEN cDNA 4930557B15 gene	4.05
Gm4988	predicted gene 4988	4.04
Ppef1	protein phosphatase with EF hand calcium-binding domain 1	4.02
	lincRNA:chrX:121032646-121038407 reverse strand	3.87
	lincRNA:chrX:121520904-121524132 forward strand	3.86
Gm1993	predicted gene 1993	3.70
Tsga8	testis specific gene A8	3.48
Mid1	midline 1	3.46
1700003E24Rik	Gm5941 pseudogene	3.43
Gm5072	predicted gene 5072	3.42
Usp51	ubiquitin specific protease 51	3.23
	predicted gene 7113	3.20
		3.14
Gm14625	predicted gene 14625	3.06
	predicted pseudogene 5753	2.86
	predicted gene 8334	2.74
1700080O16Rik	RIKEN cDNA 1700080O16 gene	2.70
Arhgap36	Rho GTPase activating protein 36	2.69
Gm16189	predicted gene 16189	2.63
Zcchc13	zinc finger, CCHC domain containing 13	2.60
	predicted gene 7173	2.54
Rhox3e	reproductive homeobox 3E	2.54
Slx	Sycp3 like X-linked	2.46
Avpr2	arginine vasopressin receptor 2	2.45
Gpr82	G protein-coupled receptor 82	2.43
H2bfm	H2B histone family, member M	2.43
LOC102637882	pituitary homeobox 3-like	2.42
		2.39
Gm16462	predicted gene 16462	2.39
Gm5168	predicted gene 5168	2.36
Gm15205	predicted gene 15205	2.36
Slitrk4	SLIT and NTRK-like family, member 4	2.33

アノテーションのない遺伝子(プローブ)は空白で示した。

表4. C *D1Pas1*^{-/-} 精巣において発現が上昇していた遺伝子のうち
X 染色体上に存在する遺伝子

GeneSymbol	GeneName or Description	Fold Change
Rhox3f	reproductive homeobox 3F	2.31
Rhox3a	reproductive homeobox 3A	2.31
Gm7173	predicted gene 7173	2.31
Gm15104	predicted gene 15104	2.29
Magea5	melanoma antigen, family A, 5	2.28
Rhox3h	reproductive homeobox 3H	2.28
		2.24
	predicted gene 14729	2.23
Rpgr	retinitis pigmentosa GTPase regulator	2.21
Cldn34b1	claudin 34B1	2.20
2010204K13Rik	RIKEN cDNA 2010204K13 gene	2.19
LOC105243826	uncharacterized LOC105243826	2.18
Gm8787	predicted gene 8787	2.17
Cldn34b2	claudin 34B2	2.15
Gm16404	predicted gene 16404	2.14
Gm5941	predicted gene 5941	2.12
Gm2030	predicted gene 2030	2.11
	predicted gene 5942	2.10
		2.09
Scml1	Vsex comb on midleg-like 1 (Drosophila)	2.09
Xk	Kell blood group precursor (McLeod phenotype) homolog	2.09
3830403N18Rik	RIKEN cDNA 3830403N18 gene	2.08
Magea8	melanoma antigen, family A, 8	2.07
Gm5925	germ cell-less homolog 1 family pseudogene	2.05
Hypm	huntingtin interacting protein M	2.04
	predicted gene 7173	2.04
Piga	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A	2.04
Magea5	melanoma antigen, family A, 5	2.04
Gm15023	predicted gene 15023	2.02
Magea6	melanoma antigen, family A, 6	2.02
Magea8	melanoma antigen, family A, 8	2.01
Magea1	melanoma antigen, family A, 1	2.01

アノテーションのない遺伝子(プローブ)は空白で示した。